

Aus der Medizinischen Klinik II
des Klinikums Großhadern
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

LIPOPROTEINE IN PLEURAERGÜSSEN BENIGNER,
MALIGNER UND TUBERKULÖSER GENESE:
GRUNDLAGEN UND KLINISCHE BEDEUTUNG

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eva Weiser
München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. D. Jüngst

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 1986

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Literaturübersicht	1
1.2	Problemstellung	3
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1	Patientenkollektiv	4
2.1.1	Patienten mit benignen Grunderkrankungen	4
2.1.2	Patienten mit malignen Grunderkrankungen	5
2.1.3	Patienten mit tuberkulösen Grunderkrankungen	5

		Seite
2.2	Methodik	6
2.2.1	Vorbereitung des Probenmaterials und Untersuchungsgang	6
2.2.1.1	Reagenzien	6
2.2.1.2	Durchführung	6
2.2.2	Proteinbestimmung	10
2.2.2.1	Reagenzien und Geräte	10
2.2.2.2	Durchführung	11
2.2.3	Cholesterinbestimmung	11
2.2.3.1	Reagenzien und Geräte	12
2.2.3.2	Durchführung	12
2.2.4	Triglyceridbestimmung	13
2.2.4.1	Reagenzien und Geräte	13
2.2.4.2	Durchführung	13

		Seite
2.2.5	Bestimmung der Gesamtphospholipide	14
2.2.5.1	Reagenzien und Geräte	14
2.2.5.2	Durchführung	15
2.2.6	Ultrafiltration	17
2.2.6.1	Material und Geräte	17
2.2.6.2	Durchführung	17
2.2.7	Inkubation mit radioaktivem Tracer	17
2.2.7.1	Reagenzien	17
2.2.7.2	Durchführung	17
2.2.8	Gelchromatographische Fraktionierung	18
2.2.8.1	Reagenzien und Geräte	18
2.2.8.2	Durchführung	18
2.2.8.2.1	Vorbereitung der Säule	18
2.2.8.2.2	Bestimmung des Ausschlußvolumens	19
2.2.8.2.3	Säuleneichung	19

		Seite
2.2.8.2.4	Probenfraktionierung	20
2.2.9	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	20
2.2.9.1	Reagenzien und Geräte	20
2.2.9.2	Durchführung	21
2.2.10	Lipiddünnschichtchromatographie	21
2.2.10.1	Reagenzien und Geräte	22
2.2.10.2	Durchführung	22
2.2.11	Phospholipiddünnschichtchromatographie	23
2.2.11.1	Reagenzien und Geräte	23
2.2.11.2	Durchführung	24
2.2.12	Immundiffusion nach Ouchterlony	24
2.2.12.1	Reagenzien und Geräte	24
2.2.12.2	Durchführung	25

		Seite
2.2.13	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	26
2.2.13.1	Reagenzien und Geräte	26
2.2.13.2	Durchführung	28
2.2.13.2.1	Vorbereitung der Proben	28
2.2.13.2.2	Vorbereitung der Polymerisations- kammer	28
2.2.13.2.3	Herstellung des Porengradientengels	29
2.2.13.2.4	Durchführung der Elektrophorese	30
2.2.13.2.5	Silberfärbung nach Merril	31
2.2.13.2.6	Auswertung der Elektrophorese	31
2.2.14	Kohlenhydrataffinitätschromatographie	32
2.2.14.1	Reagenzien und Geräte	32
2.2.14.2	Durchführung	32
2.2.15	Gelchromatographie über Sephacryl S 1000	33
2.2.15.1	Reagenzien und Geräte	33
2.2.15.2	Durchführung	34

		Seite
3.	ERGEBNISSE	35
3.1	Protein- und Lipidkonzentrationen in Nativergüssen	35
3.1.1	Patienten mit benignen Grunderkrankungen	35
3.1.2	Patienten mit malignen Grunderkrankungen	36
3.1.3	Patienten mit tuberkulösen Grunderkrankungen	37
3.2	Korrelationen der Protein- und Lipidkonzentrationen	43
3.3	Gelchromatographische Präparation der Ergüsse	45
3.3.1	Bestimmung des Ausschlußvolumens	45
3.3.2	Säuleneichung	47

	Seite
3.3.3	Gelchromatographie von Material aus Ergüssen benigner Genese 49
3.3.4	Gelchromatographie von Material aus Ergüssen maligner Genese 51
3.3.5	Gelchromatographie von Material aus Ergüssen tuberkulöser Genese 52
3.4	Recovery-Ermittlung der Lipide und Proteine 52
3.5	Biochemische Untersuchung des hoch- molekularen Materials aus dem Aus- schlußvolumen der Säulenchromato- graphie 53
3.5.1	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation 53
3.5.2	Quantitative Protein- und Lipid- analytik 56
3.5.3	Qualitative Lipidanalytik 56
3.5.3.1	Lipiddünnschichtchromatographie 56

		Seite
3.5.3.2	Phospholipiddünnschichtchromatographie	58
3.5.4	Immundiffusion nach Ouchterlony	60
3.5.5	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	63
3.5.5.1	Material aus Ergüssen benigner Genese	63
3.5.5.2	Material aus Ergüssen maligner Genese	64
3.5.5.3	Material aus Ergüssen tuberkulöser Genese	66
3.5.6	Kohlenhydrataffinitätschromatographie	66
3.5.7	Gelchromatographie über Sephacryl S 1000	68

		Seite
4.	DISKUSSION	71
4.1	Patientengut	71
4.2	Methodik	72
4.2.1	Vorbereitung des Probenmaterials	72
4.2.2	Proteinbestimmung	73
4.2.3	Lipidbestimmungen	73
4.2.4	Inkubation mit radioaktivem Tracer	73
4.2.5	Säulenchromatographie über Biogel A 15m	74
4.2.6	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	74
4.2.7	Qualitative Lipidanalytik	75
4.2.8	Immundiffusion nach Ouchterlony	75
4.2.9	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	76

	Seite
4.2.10 Kohlenhydrataffinitätschromatographie	76
4.2.11 Gelchromatographie über Sephacryl S 1000	77
4.3 Ergebnisse	77
4.3.1 Protein- und Lipidkonzentrationen in Nativergüssen	77
4.3.2 Korrelationen der Protein- und Lipidkonzentrationen	81
4.3.3 Gelchromatographische Präparation der Ergüsse	82
4.3.4 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	82
4.3.5 Quantitative Protein- und Lipid- analytik	82
4.3.6 Qualitative Lipidanalytik	82
4.3.7 Immundiffusion nach Ouchterlony	83
4.3.8 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	83

	Seite
4.3.9 Kohlenhydrataffinitätschromatographie	83
4.3.10 Gelchromatographie über Sephacryl S 1000	84
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	85
6. LITERATURVERZEICHNIS	88

1. EINLEITUNG

1.1 Literaturübersicht

Bereits in der vorhippokratischen Zeit war der Begriff der "Pleuritis" bekannt, wobei jedoch noch viele Jahrhunderte unterschiedliche Auffassungen über Lokalisation und Ätiologie vertreten wurden.

Erst 1761 verlegte Boerhaave den Erkrankungsort in die Pleura. 1818 wurde durch Pinel die Pleuritis definitiv in die Reihe der Entzündungen der serösen Häute eingeordnet und seitdem als nosologisch selbständiges Krankheitsbild bezeichnet (19).

Zu dieser Zeit waren auch die häufigsten Ursachen von Pleuraergüssen bekannt; das weitere Interesse galt nun der Untersuchung der Ergüsse, um einen Rückschluß auf ihre jeweilige Genese ziehen zu können.

Um Exsudate von Transsudaten unterscheiden zu können, wurde als wohl älteste Untersuchungsmethode die Bestimmung des spezifischen Gewichtes mittels Aerometer eingeführt (30).

1895 führte Rivalta die nach ihm benannte Rivalta'sche Probe ein; sie gilt als positiv, wenn ein Tropfen des Pleurapunktates einen wolkeigen Niederschlag in verdünnter Essigsäure hinterläßt (19).

Sowohl das spezifische Gewicht als auch die Rivalta-Probe

korrelieren gut mit dem Gesamteiweißgehalt des Ergusses. Heute gelten als Exsudate Ergüsse mit einem spezifischen Gewicht von über 1014 (6,7), über 1016 (33) oder über 1017 (33), positiver Rivalta-Probe und einem Proteingehalt von über 2,5 (6,7) oder über 3,0 g/100 ml (5,17,32, 33). Als Transsudate werden Ergüsse definiert mit einem spezifischen Gewicht unter 1008 (6), unter 1012 (6) oder unter 1016 (32), negativer Rivalta-Probe und einem Proteingehalt unter 2,0 (17,33), unter 2,5 (6,32) oder unter 3,0 g/100ml (5,32,42).

Schon 1930 hat Tilselius erstmals eiweißhaltige Körperflüssigkeiten durch Elektrophorese aufgetrennt (19); bei weiteren Versuchen ergaben sich folgende Resultate:

Stauungsergüsse weichen am stärksten vom Serumeiweißbild ab, Exsudate sind fast mit dem Serum identisch (18). Bei den Transsudaten fällt eine relative Zunahme des Albumins und eine Abnahme der Globuline gegenüber dem Blutserum auf (18,20,27,29,33,37), während bei Exsudaten eine relative Zunahme des Albumins und eine Zunahme der Globuline bis zur Angleichung an Serumwerte zu verzeichnen ist (8, 12,18,27,34,39,41).

Weniger gut untersucht wurden die Lipide in Pleuraergüssen. Die Lipidkonzentrationen im Pleuraerguß sind niedriger als im Blutserum, wobei aber Ergüsse maligner Genese höhere Werte als diejenigen nicht-maligner Genese aufweisen. Die Cholesterinkonzentrationen maligner Ergüsse liegen bei 80 - 100 mg/ml, die der benignen bei 40 - 50 mg/ml (19). Auch in anderen Körperflüssigkeiten wurde der

Cholesteringehalt untersucht. So fand Martin (23) 1983 in Aszites maligner Genese höhere Cholesterinwerte als in Aszites benigner Genese, wobei hier als Grenze zwischen maligne und benigne eine Konzentration von 50 mg/ml festgelegt wurde. Für diesen Wert lag bezüglich der Unterscheidung benigne/maligne die Sensitivität bei 96%, die Spezifität bei 100%. Diese hohe Diskriminationsfähigkeit wurde von keinem anderen biochemischen Parameter, wie Protein-, Triglycerid- oder Phospholipidkonzentration, erreicht.

Diese Ergebnisse lassen es nun als interessant erscheinen, vergleichbare Untersuchungen auch auf die pathologische Körperflüssigkeit Pleuraerguß anzuwenden.

1.2 Problemstellung

Es war Ziel der vorliegenden Arbeit,

1. in Pleuraergüssen benigner, maligner und tuberkulöser Genese zu untersuchen, in welcher Form Lipide und Proteine vorliegen
2. diese mit den anschließend aufgeführten Methoden zu isolieren und näher zu charakterisieren
3. gegebenenfalls einen Unterschied zwischen benigne, maligne und tuberkulös bedingten Pleuraergüssen zu beschreiben
4. eine Aussage über die Herkunft von Lipiden und Proteinen im Pleuraerguß zu treffen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden Pleuraergüsse von 100 Patienten untersucht. Die Patienten befanden sich stationär in den Medizinischen Kliniken I - III des Klinikums Großhadern, in den Inneren und Chirurgischen Abteilungen des Kreiskrankenhauses Pasing und in der Inneren Abteilung des Krankenhauses des Dritten Ordens in München.

Die Diagnosen wurden den jeweiligen Krankenblättern entnommen; sie stützten sich auf röntgenologische, endoskopische, bronchoskopische, computertomographische, histologische und/oder zytologische Befunde.

2.1.1 Patienten mit benignen Grunderkrankungen

Es wurden insgesamt 16 Punktate von Patienten mit benignen Grunderkrankungen untersucht:

Diagnose	Anzahl	Alter
Herzinsuffizienz	9	39 - 82 J.
Leberzirrhose	3	43 - 51 J.
Pneumonie	2	35 - 44 J.
Vasculitis allergica	1	53 J.
Chronische Polyarthrit	1	54 J.

2.1.2 Patienten mit malignen Grunderkrankungen

Hier wurden 76 Ergußpunktate von Patienten mit malignen Grunderkrankungen untersucht.

Diagnose	Anzahl	Alter
Mammacarcinom	28	30 - 81 J.
Bronchialcarcinom	11	16 - 81 J.
Hypernephrom	8	31 - 62 J.
Non-Hodgkin-Lymphom	7	23 - 79 J.
Hodgkin-Lymphom	5	23 - 79 J.
Magen-/Darmcarcinom	5	38 - 67 J.
Adenocarcinom der Lunge	5	50 - 66 J.
Pleuramesotheliom	3	75 - 80 J.
Thymom	2	35 - 49 J.
Embryonales Hodencarcinom	1	23 J.
Leiomyosarkom	1	64 J.

2.1.3 Patienten mit tuberkulösen Grunderkrankungen

Es wurden die Pleurapunktate von 8 Patienten mit Lungentuberkulose im Alter von 17 - 62 Jahren untersucht.

2.2 Methodik

2.2.1 Vorbereitung des Probenmaterials und Untersuchungsgang

2.2.1.1 Reagenzien

- Selecta - Faltenfilter Nr. 1117%, Fa. Schleicher-Schüll
- Natriumazid NaN_3 , Fa. Merck, Darmstadt
- Phenylmethansulfonylfluorid PMSF, Fa. Merck, Darmstadt

2.2.1.2 Durchführung

Die Pleuraergüsse wurden entweder sofort nach Punktion verarbeitet oder portionsweise bei -70°C tiefgefroren und dann erst unmittelbar vor der Weiterverarbeitung schonend aufgetaut.

Einmal aufgetaute Proben wurden nicht wieder eingefroren, sondern, falls nicht verarbeitet, verworfen.

Pleuraergüsse mit makroskopisch erkennbarer Blutbeimengung (über 0,5 bis 1,0 ml Blut pro Liter Erguß) wurden nicht zur Weiteraufbereitung verwendet, um Serumbestandteile im Pleuraerguß durch Einbluten auszuschließen.

Zunächst wurden Kontaminationen wie Schleim, Zellbestandteile und Fibringerinnsel durch Filtration mit einem Faltenfilter entfernt, wobei auch die Ergußmenge bestimmt wurde.

Anschließend wurden pro 100 ml Pleuraerguß 0,2 mg Natriumazid (NaN_3) und 0,05 mmol Phenylmethansulfonylfluorid

(PMSF) zugesetzt, um Bakterienwachstum im Punktat zu verhindern.

In sämtlichen Proben wurde eine quantitative Protein- und Lipidanalytik durchgeführt, bestehend aus einer Protein-, Cholesterin- und Triglyceridbestimmung sowie einer Messung der Gesamphospholipide.

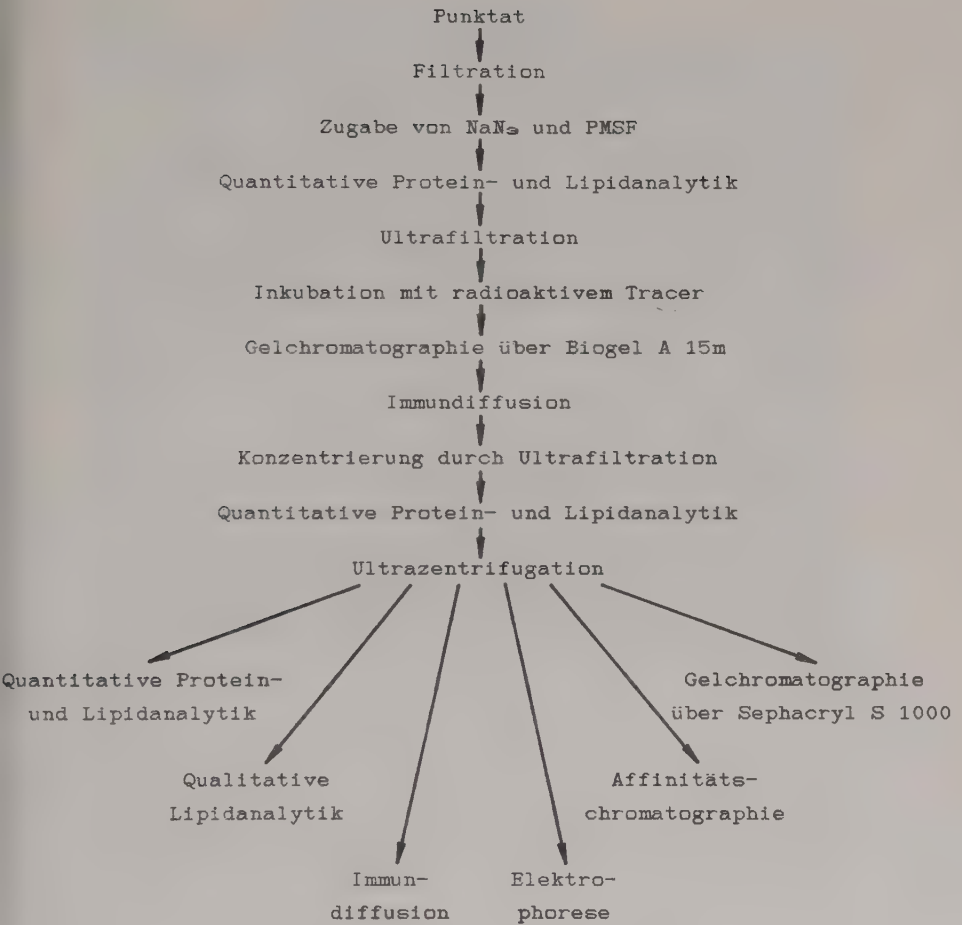
Bei 6 Patienten mit benignen, 24 Patienten mit malignen und 2 Patienten mit tuberkulösen Pleuraergüssen wurden weitere eingehende biochemische Untersuchungen des Punktats vorgenommen.

Hierzu wurden die Proben für die weitere Präparation durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Nach Zugabe eines radioaktiven Cholesterin-Tracers erfolgte die gelchromatographische Fraktionierung des Ergusses über Biogel A 15m, wobei drei verschiedene Protein- und Lipidpeaks getrennt werden konnten. Diese Fraktionen wurden durch nochmalige Ultrafiltration aufkonzentriert und anschließend erneut einer quantitativen Protein- und Lipidbestimmung unterzogen, um die Substanzverluste während der Aufarbeitung verfolgen zu können.

Nachdem durch immunologische Untersuchungen sowie durch Bestimmung der typischen prozentualen Protein- und Lipidverteilung der zweite und dritte Peak als LDL und HDL identifiziert werden konnten, wurde nur noch das Material des ersten Peaks weiterverarbeitet und im einzelnen mit folgenden Verfahren weiteruntersucht:

- Dichtegradienten-Ultrazentrifugation
- quantitative Protein- und Lipidanalytik:
 - Proteinbestimmung
 - Cholesterinbestimmung
 - Triglyceridbestimmung
 - Bestimmung der Gesamphospholipide
- Immundiffusion nach Ouchterlony
- qualitative Lipidanalytik
 - Lipiddünnschichtchromatographie
 - Phospholipiddünnschichtchromatographie
- Elektrophorese
- Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose
- Gelchromatographie über Sephacryl S 1000

Näheren Aufschluß über die einzelnen Schritte gibt das nachfolgende Flußdiagramm:



2.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit der von Lowry angegebenen Methode durchgeführt (21).

Testprinzip:

In alkalischer Lösung wird ein Kupfer-Protein-Komplex gebildet, der eine Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Verbindung (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz) reduziert; dabei entsteht eine Blaufärbung, deren Extinktion spektralphotometrisch bei 750 nm bestimmt wird.

2.2.2.1 Reagenzien und Geräte

- Natriumcarbonat NaCO_3 , Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxid NaOH , Fa. Merck, Darmstadt
- Kupfersulfat CuSO_4 , Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumcitrat, Fa. Merck, Darmstadt
- Rinderalbumin, Fa. Merck, Darmstadt
- Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz, Fa. Merck, Darmstadt
- Präzisions-Quarzküvetten 1cm, Fa. Hellma, Mülheim
- Spektralphotometer Model 24, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA.

2.2.2.2 Durchführung

Zunächst wurden folgende Lösungen hergestellt:

Lösung A: 2% NaCO_3 in 0,1n NaOH

Lösung B: 0,5% CuSO_4 in 1%-iger Citratlösung

Lösung C: 50,0 ml Lösung A + 1,0 ml Lösung B,
vor Gebrauch immer frisch herzustellen

Lösung D: Folin-Reagenz.

Zur Proteinbestimmung wurden 0,2 ml der Probe mit 1,0 ml der Lösung C versetzt, auf dem Vibrationsmischer gemischt und 10 min bei 20°C inkubiert. Für den Reagenzienleerwert wurde anstelle der Probe 0,2 ml Aqua bidest. einpipetiert.

Anschließend wurden 0,1 ml der Lösung D zugegeben und nach gutem Mischen 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde die Extinktion bei 750 nm gegen den Reagenzienleerwert in Präzisions-Quarzküvetten gemessen. Die Konzentration der jeweiligen Probe wurde einer Eichkurve entnommen, die aus den Extinktionen einer Standardreihe, die 10, 25, 50, 100, 200 und 400 mg/100ml Rinderalbumin enthielt, erstellt worden war.

2.2.3 Cholesterinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtcholesterins erfolgte mit einem enzymatischen Farbstest nach der CHOD-PAP-Methode (31,38).

Testprinzip:

Cholesterinesterase spaltet von Cholesterinestern das Cholesterin ab, das zusammen mit Sauerstoff unter der Katalyse der Cholesterinoxidase Peroxid (H_2O_2) entstehen läßt.

H_2O_2 reagiert mit 4-Aminophenazon und Phenol durch die Peroxidase zu 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon. Die Extinktion dieses rosa Farbkomplexes kann spektralphotometrisch bei 546 nm gemessen werden.

2.2.3.1 Reagenzien und Geräte

- Test-Kombination Cholesterin, Fa. Boehringer, Mannheim
- Precilip E.L., Fa. Boehringer, Mannheim
- Präzisions-Quarzküvetten, 1 cm, Fa. Hellma, Mülheim
- Spektralphotometer Model 24, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA.

2.2.3.2 Durchführung

20 µl der Probe wurden mit 2 ml des nach Vorschrift angesetzten Cholesterinreagenz versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde anschließend bei 546 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Nach Multiplikation des Extinktionswertes mit 855 ergab sich die Konzentration des Gesamtcholesterins in mg pro 100 ml. Zur Qualitätskontrolle wurde jeweils ein Testansatz mit definierter Cholesterinkonzentration (Precilip) mitgeführt.

2.2.4 Triglyceridbestimmung

Die Triglyceridbestimmung wurde mit einem vollenzymatischen UV-Test durchgeführt (40).

Testprinzip:

Triglyceride werden durch Lipase und Esterase in Fettsäuren und Glycerin gespalten. Glycerin und ATP reagieren durch die Glycerokinase zu ADP, dieses mit Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat. Pyruvat wird zusammen mit NADH/H durch die Lactatdehydrogenase zu Laktat und NAD umgewandelt; aus der Extinktion des gebildeten NAD ist die Triglyceridkonzentration zu berechnen.

2.2.4.1 Reagenzien und Geräte

- Testkombination Triglyceride, Fa. Boehringer, Mannheim
- Precilip E.L., Fa. Boehringer, Mannheim
- Präzisions-Quarzküvetten 1 cm, Fa. Hellma, Mülheim
- Spektralphotometer Model 24, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA

2.2.4.2 Durchführung

50 µl der Probe wurden mit 2,5 ml der vorschriftsmäßig angesetzten Reagenzlösung gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 365 nm die Extinktion gegen den Leerwert gemessen. Nach Zugabe der Glycerokinase enthaltenden Lösung und erneuter 10-minütiger Inkubation wurde wiederum die Extinktion bestimmt. Aus den gewonnenen Werten ließ sich nach Differenzbildung und

Multiplikation mit dem Faktor 1318 die Triglyceridkonzentration in mg/100ml bestimmen. Auch hier diene zur Qualitätskontrolle jeweils ein Testansatz unter Verwendung des Precilip-Standards.

2.2.5 Bestimmung der Gesamthospholipide

Die Gesamthospholipide wurden nach Fiske-Subbarow bestimmt (10).

Testprinzip:

Das kolorimetrische Nachweisverfahren für Phosphor bei 830 nm beruht auf der Bildung eines Farbkomplexes in saurer Lösung durch das Fiske-Subbarow-Reagenz in Anwesenheit von Schwefelsäure, Perhydrol und Ammoniumheptamolybdat. Aus der Extinktion des blauen Farbkomplexes läßt sich die Phospholipidkonzentration errechnen.

2.2.5.1 Reagenzien und Geräte

- Natriumsulfit, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumdisulfit, Fa. Merck, Darmstadt
- 1-amino-2-hydroxy-Naphtaleinsulfonsäure, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumammoniumhydrogenphosphat, Fa. Merck, Darmstadt
- Chloroform, Fa. Merck, Darmstadt
- Methanol, Fa. Merck, Darmstadt
- Schwefelsäure H_2SO_4 10n, Fa. Merck, Darmstadt
- Perhydrol, Fa. Merck, Darmstadt
- Ammoniumheptamolybdat, Fa. Merck, Darmstadt

- Präzisions-Quarzküvetten 1 cm, Fa. Hellma, Mülheim
- Spektralphotometer Model 24, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA

2.2.5.2 Durchführung

Zunächst mußten die Reagenz- und Standardlösungen entsprechend der nachfolgenden Rezeptur hergestellt werden:

a) Fiske-Subbarow-Reagenz:

Lösung I: 6,86 g Natriumdisulfit in 50,0 ml Aqua bidest. lösen, 0,125 g 1-amino-2-hydroxy-Naphtaleinsulfonsäure zugeben und 2 - 3 Stunden auf dem Magnetrührer bis zum Lösen mischen.

Lösung II: 1,5 g Natriumsulfit in 5,0 ml Aqua bidest. lösen.

Gebrauchsfertige Lösung: Lösung II tropfenweise in Lösung I geben, bis die Trübung verschwindet, wozu ca. 1 ml der Lösung II notwendig ist.

b) Standardlösung:

209,7 mg Natriumammoniumhydrogenphosphat ad 100 ml Aqua bidest (entsprechend einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$).

Von dieser Stammlösung ausgehend erhält man durch Verdünnen mit Aqua bidest die Gebrauchslösungen mit den Konzentrationen 10, 25, 50, 75 und 100 nmol/l. Diese Standardreihe diente der Erstellung der Eichkurve.

Zur Bestimmung der Phospholipidkonzentration wurden 0,1 ml Probenmaterial und 1,0 ml Aqua bidest. in Schliffstopfengläser pipettiert, 4,0 ml Chloroform/Methanol 1:1 zugefügt und auf dem Vibrationsmischer kurz geschüttelt. Nach 10-minütigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurden die Proben 30 sec stark geschüttelt, 4,0 ml Chloroform und 1,0 ml Aqua bidest zugesetzt, geschüttelt und wieder 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert.

Anschließend wurde 15 min bei 2500 upm zentrifugiert, der wäßrige Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, 5,0 ml der Chloroformphase in Reagenzgläser pipettiert und im Wasserbad bei 40°C unter N₂ eingetrocknet. Dieser Rückstand wurde mit 1,0 ml Aqua bidest. und 0,5 ml 10n Schwefelsäure wieder aufgelöst und 3 Stunden bei 150°C im Trockenschrank inkubiert.

Von der Standardreihe wurden je 1,0 ml mit 0,5 ml 10n Schwefelsäure versetzt und ebenfalls im Trockenschrank inkubiert.

Nach Abkühlung wurden je 2 Tropfen Perhydrol mit der Pasteurpipette zugegeben und die Proben nochmals für 1,5 Stunden bei 150°C im Trockenschrank inkubiert.

Anschließend wurden die Proben mit 4,6 ml 0,22%-igem Ammoniumheptamolybdat sowie 0,2 ml Fiske-Subbarow-Reagenz versetzt, gut geschüttelt und genau 7 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach erfolgter Abkühlung und heftigem Schütteln wurde die Extinktion bei 830 nm am Spektralphotometer abgelesen; die Konzentration der Phospholipide

konnte der Standardkurve entnommen werden, die anhand der Extinktionen der Standardlösungen bekannter Konzentration erstellt worden war.

2.2.6 Ultrafiltration

2.2.6.1 Material und Geräte

- XM 100 - Ultrafiltrationsmembranen, Fa. Amicon, Danvers, Mass., USA
- Rührzelle 402, Fa. Amicon, Danvers, Mass., USA
- Rührzelle 52, Fa. Amicon, Danvers, Mass., USA.

2.2.6.2 Durchführung

Die Probe wurde bei 4°C im Kühlraum unter Stickstoffüberdruck von 1 bar bei vorsichtigem Rühren auf ca. 10% des Ausgangsvolumens eingeeengt.

2.2.7 Inkubation mit radioaktivem Tracer

2.2.7.1 Reagenzien

- (1,2-³H(N))-Cholesterol Net. 139, Fa. New England Nuclear, Boston, Mass., USA

2.2.7.2 Durchführung

Pro ml Probe wurden 0,1 µCi radioaktiv markierten Cholesterins zugegeben und das Material 2 Stunden bei 20°C auf dem Magnetrührer inkubiert (11).

2.2.8 Gelchromatographische Fraktionierung

2.2.8.1 Reagenzien und Geräte

- Biogel A 15m, 200 - 400 mesh, Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca., USA
- Dextran 5000, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Natriumchlorid NaCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Dinatriumäthylendinitrilotetraessigsäure Na_2EDTA , Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumazid NaN_3 , Fa. Merck, Darmstadt
- Phenylmethansulfonylfluorid PMSF, Fa. Merck, Darmstadt
- Szintillationslösung, Fa. Roth, Karlsruhe
- Glassäule 120 cm Länge x 1,8 cm Innendurchmesser, Fa. Bender und Hobein, München
- Fraktionskollektor Model 328, Fa. Instrumentation Specialties Co., Lincoln, Nebr., USA
- Präzisions-Quarzküvetten 1 cm, Fa. Hellma, Mülheim
- Spektralphotometer Model 24, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA
- Zählröhrchen, Fa. W. Zinsser, Frankfurt
- Szintillationszähler Betaszint BF 5000, Fa. BF-Vertriebs-GmbH, München

2.2.8.2 Durchführung

2.2.8.2.1 Vorbereitung der Säule

Vor Benutzung wurde die Säule sorgfältig gereinigt. Nach Hydrierung und Entgasen wurde das Biogel A 15m an einem

Glasstab luftblasenfrei in die Säule eingelassen, 8 - 10 Stunden zur Stabilisierung stehen gelassen und dann mit dem etwa 3-fachen Säulenvolumen gespült. Als Elutionslösung wurde ein Puffer mit 0,15 mol/l NaCl, 0,1 g Na₂EDTA, 0,2 g NaN₃ auf 1000 ml Aqua bidest., pH 7,0, verwendet. Ein passend zugeschnittenes Filterpapier wurde auf das Gelbett gelegt, um Verunreinigungen des Gels durch später aufgetragene Proben zu vermeiden.

2.2.8.2.2 Bestimmung des Ausschlußvolumens

Hierzu wurden 4 ml Dextran 5000 auf die Säule aufgetragen und nach dem Einsickern bei einem Druck von 30 cm H₂O und einer Fließgeschwindigkeit von 9,3 - 12,4 ml/h entsprechend einer Tropfenzahl von 150 - 200 pro Stunde unter Verwendung der obengenannten Pufferlösung eluiert.

Nach Sammeln der Fraktionen zu je 9,3 ml wurde jeweils die Extinktion bei 280 nm gemessen und das Ergebnis graphisch dargestellt.

2.2.8.2.3 Säuleneichung

Die Eichung der Säule erfolgte durch Zugabe und Eluierung von 4 ml menschlichen Plasmas, das mit 0,4 µCi ³H-Cholesterol inkubiert worden war (16).

Wiederum wurden 80 Fraktionen zu je 9,3 ml gesammelt. Es wurde jeweils die Extinktion bei 280 nm gemessen; nach Abpipettieren eines Aliquots von 100 µl aus jeder Fraktion in je ein Szintillationsröhrchen und Zugabe von 5 ml Szintillationslösung erfolgte die Radioaktivitätsmessung

im Betaszint 5000 durch Zählen der abgegebenen Impulse pro Minute.

2.2.8.2.4 Probenfraktionierung

Die Auftrennung der vorbereiteten Pleuraergußproben erfolgte unter den oben angegebenen Bedingungen. In jeder einzelnen gewonnenen Fraktion zu 9,3 ml wurden die Extinktion bei 280 nm sowie die Radioaktivität gemessen und das Ergebnis graphisch dargestellt. Dabei ergaben sich bis zu 4 verschiedene Radioaktivitätspeaks; die entsprechenden Fraktionen wurden zusammengefaßt und für die weitere Verarbeitung durch Ultrafiltration auf 1 - 2 ml eingeengt.

2.2.9 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (14, 15,28)

2.2.9.1 Reagenzien und Geräte

- Cäsiumchlorid .CsCl, Fa. Feinbiochemica, Heidelberg
- Cellulosenitrat-Zentrifugenröhrchen, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA
- Dialyseschlauch, Fa. Spectrapor, Reichelt-Chemie
- Rotor SW 60,, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA
- Ultrazentrifuge Model L5-75,, Fa. Beckman Instruments Inc., Fullerton, Ca., USA.

2.2.9.2 Durchführung

0,5 ml des bereits radioaktiv markierten Materials wurden mit etwa 4 ml optisch reiner Cäsiumchloridlösung der Dichte 1,25 mg/ml in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und 72 Stunden lang bei 50.000 upm, 4°C und einem Vakuum von 1 - 2 Torr einer isopyknischen Ultrazentrifugation ausgesetzt.

Anschließend wurde der entstandene Dichtegradient in 11 Fraktionen zu je 0,4 ml vorsichtig abpipettiert. Nach Einbringen von 0,1 ml jeder Fraktion in 5,0 ml Szintillationslösung konnte im Betaszint die Radioaktivität gemessen werden. Die Extinktion wurde bei 280 nm im Spektralphotometer gemessen. Durch Abwiegen von 0,2 ml jeder Fraktion auf einer Präzisionswaage wurde die Dichte ermittelt.

Die peakbildenden Fraktionen wurden gepoolt und in einem semipermeablen Dialyseschlauch 48 Stunden bei 4°C gegen Aqua bidest. dialysiert, um die gelösten Salze zu entfernen.

2.2.10 Lipiddünnschichtchromatographie

Die qualitative Lipiddünnschichtchromatographie wurde nach der von Stahl angegebenen Methode durchgeführt (35). Mit diesem Verfahren können Lipidgemische in Mono-, Di- und Triglyceride sowie freies Cholesterin, Cholesterinester und Phospholipide aufgetrennt werden.

2.2.10.1 Reagenzien und Geräte

- Chloroform, Fa. Merck, Darmstadt
- Methanol, Fa. Merck, Darmstadt
- Petrolbenzin, Fa. Merck, Darmstadt
- Eisessig, Fa. Merck, Darmstadt
- Diäthyläther, Fa. Merck, Darmstadt
- Jod, p.a., doppelt sublimiert, Fa. Merck, Darmstadt
- Monopalmitat, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Dipalmitat, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Tripalmitat, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Cholesterin, Fa. Merck, Darmstadt
- Cholesterylmyristate, Fa. Sigma Chemical Co.,
St. Louis, USA
- Lecithin, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-245 20 x 20 cm, Fa.
Merck, Darmstadt

2.2.10.2 Durchführung

0,1 ml Probenmaterial wurden mit 1,0 ml Aqua bidest. versetzt, die Lipide durch 8,0 ml Chloroform/Methanol im Mischungsverhältnis 3:1 extrahiert und dann 5,0 ml der Chloroformphase unter N₂ eingedampft.

Dieser Extrakt wurde ebenso wie die Lipidstandards in 0,1 ml Chloroform gelöst und mit einer Pasteurpipette auf die Kieselgel-Dünnschichtchromatographie-Platten aufgetragen. Als Fließmittel diente Petrolbenzin/Diäthyläther/Eisessig im Mischungsverhältnis 90:90:1.

Nach beendetem Lauf wurden nach Trocknen der DC-Platte die einzelnen Fraktionen mit Joddampf angefärbt. Die Identifizierung der Banden erfolgte anhand der gleichzeitig mitlaufenden Lipidstandards, für die Mono-, Di- und Tripalmitat sowie Cholesterin, Cholesterylmyristate und Lecithin verwendet wurden.

2.2.11 — Phospholipiddünnschichtchromatographie

Die qualitative Auftrennung der Phospholipide wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nach der von Stahl angegebenen Methode durchgeführt (22).

2.2.11.1 Reagenzien und Geräte

- Chloroform, Fa. Merck, Darmstadt
- Methanol, Fa. Merck, Darmstadt
- Jod, p.a., doppelt sublimiert, Fa. Merck, Darmstadt
- Phosphatidylinositol, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Phosphatidylcholin, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Phosphatidyläthanolamin, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Sphingomyelin, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254 20 x 20 cm, Fa. Merck, Darmstadt

2.2.11.2 Durchführung

0,1 ml Probenmaterial wurde mit 1,0 ml Aqua bidest. versetzt, die Lipide durch 8,0 ml Chloroform/Methanol im Mischungsverhältnis 3:1 extrahiert und dann 5,0 ml der Chloroformphase unter N_2 eingedampft.

Dieser Extrakt wurde in 0,1 ml Chloroform/Methanol/Aqua bidest. 2:1:3 wieder aufgelöst und auf einer Kieselgel-Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen. Als Fließmittel diente Chloroform/Methanol/Aqua bidest. im Mischungsverhältnis 65:35:8.

Nach beendetem Lauf und Trocknen der Platte wurden die einzelnen Banden mit Joddampf angefärbt. Die Identifizierung der Banden erfolgte durch die gleichzeitig mitlaufenden Phospholipidstandards Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin und Sphingomyelin.

2.2.12 Immundiffusion nach Ouchterlony

Zur näheren Charakterisierung der durch Gelchromatographie isolierten Fraktionen wurde die doppelte radiale Immundiffusion nach Ouchterlony durchgeführt (25).

2.2.12.1 Reagenzien und Geräte

- 5,5-Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumacetat x 3 H_2O , Fa. Merck, Darmstadt
- Salzsäure HCl, Fa. Merck, Darmstadt

- Bacto-Agar, Fa. Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA
- Kochsalz NaCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Methanol, Fa. Merck, Darmstadt
- Eisessig, Fa. Merck, Darmstadt
- Antiserum gegen humanes Apolipoprotein A, Fa. Behring, Marburg
- Antiserum gegen humanes Apolipoprotein B, Fa. Behring, Marburg
- Antiserum gegen Humanalbumin, Fa. Behring, Marburg
- Antiserum gegen Humanserum, Fa. Behring, Marburg
- Stanze für Ouchterlony, Fa. Boskamp GmbH, Hersel/Bonn

2.2.12.2 Durchführung

Zunächst wurde der Barbital-Acetat-Puffer hergestellt durch Lösen von 13,38 g 5,5-Diäthylbarbitursäure-Natrium-salz und 8,33 g Natriumacetat in 1500 ml Aqua bidest. und Zugabe von 0,1 n Salzsäure bis zu einem pH von 8,2.

Anschließend wurden 1,5 g Bacto-Agar in 50 ml Puffer und 50 ml Aqua bidest. bis zur Bildung einer klaren Lösung erhitzt und jeweils 3 ml auf fettfreie, völlig waagrecht liegende Objektträger aufgetragen. Nach dem Erstarren der Gele wurden die Probenaufnahmelöcher mit Hilfe einer Stanze eingebracht.

Aufgetragen wurden die zu untersuchenden Proben und Antikörper gegen humanes α - und β -Lipoprotein, Humanalbumin und Humanserum.

Nach 24- bis 48-stündiger Inkubation der Gele in der feuchten Kammer bei 20°C konnten die Präzipitationslinien

ausgewertet werden. Vor dem Trocknen wurden die Gele 12 Stunden in 0,9%-ige Kochsalzlösung eingelegt. Die Färbung erfolgte in 0,5% Azokarmin, gelöst in Methanol/Eisessig 9:1; als Entfärbelösung diente wiederum Methanol/Eisessig im Mischungsverhältnis 9:1.

2.2.13 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde mit horizontalen Ultradünnschicht-Porengradientengelen durchgeführt (13). Diese Methode stellt eine Übertragung der konventionellen Flachgel-Elektrophorese nach Fehrnström und Moberg (9) mit 2,0 mm dicken Gelen auf ultradünne Gele der Stärke 0,36 mm dar.

2.2.13.1 Reagenzien und Geräte

- Trishydroxymethylaminomethan Tris, Fa. Sigma Chemical Co., St Louis, USA
- Salzsäure HCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumdodecylsulfat SDS, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- 2-Mercaptoäthanol, Fa. Merck-Schuchard, Hohenbrunn/München
- Acrylamid,, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- N,N'-Methylen-Bisacrylamid,, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin TEMED,, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg

- Bromphenolblau, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Glycerin 85%, Zentralapotheke des Klinikums Großhadern, München
- Ammoniumpersulfat, Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca., USA
- Natriumazid NaN_3 , Fa. Merck, Darmstadt
- Glycin, Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca., USA
- Electrophoresis-Calibration-Kit (MW 14.400 - 94.000), Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
- Trichloressigsäure, Fa. Merck, Darmstadt
- Methanol, Fa. Merck, Darmstadt
- Eisessig, Fa. Merck, Darmstadt
- Salpetersäure, Fa. Merck, Darmstadt
- Kaliumdichromat, Fa. Merck, Darmstadt
- Silbernitrat, Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumbicarbonat, Fa. Merck, Darmstadt
- Formalin, Fa. Merck, Darmstadt
- Lyophilisiergerät Delta II a
- Glasplatten 260 x 125 x 3 mm, Fa. LKB Produkter, Bromma, Schweden
- Küvettenklammern Bulldog, Fa. LKB Produkter, Bromma, Schweden
- PAG-Folie, Fa. LKB Produkter, Bromma, Schweden
- Parafilm, Fa. American Can Company
- Gradientenmischer, selbstgebaut aus zwei 20ml-Einwegspritzen
- Elektrophoresegerät Multiphor, Fa. LKB Produkter, Bromma, Schweden

- Stromversorgungsgerät 2197, Fa. LKB Produkter, Bromma, Schweden
- Thermostat 2209, Fa. LKB Produkter, Bromma, Schweden
- Densitometer Quick-Scan Jr. TCL, Fa. Helena Laboratories, Vertrieb Fa. Desaga GmbH & Co., Heidelberg

2.2.13.2 Durchführung

2.2.13.2.1 Vorbereitung der Proben

Die nach Ultrazentrifugation gewonnenen und durch Dialyse gereinigten Proben wurden zunächst lyophilisiert und in einem 0,0375 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,8, mit 1% SDS und 4% 2-Mercaptoäthanol gelöst, wobei die maximale Proteinkonzentration 2,5 mg/ml betrug; entsprechend wurden die Referenzsubstanzen, ein Gemisch aus 6 Markerproteinen genau definierten Molekulargewichts, vorbereitet.

Nach Inkubation der Lösungen bei 95°C für 3 min wurde ein Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:8 mit dem erwähnten Puffer erstellt.

2.2.13.2.2 Vorbereitung der Polymerisationskammer

Auf eine der beiden gut gereinigten und entfetteten Glasplatten wurden mit Parafilm 21 je 9 mm lange, 2 mm breite und 0,24 mm dicke "Slotformer" zum späteren Auftragen der Proben im Abstand von jeweils 2 mm aufgeklebt.

Auf die andere Glasplatte wurde nach Benetzen mit Aqua bidest. die PAG-Folie aufgewalzt.

Anschließend wurden die beiden Glasplatten mit der dazwischenliegenden U-förmigen Parafilm-Randdichtung mit Hilfe der Küvettenklammern zusammengefügt.

2.2.13.2.3 Herstellung des Porengradientengels

Hierzu wurden zunächst folgende Lösungen angesetzt:

A Acrylamidlösung

29,2 g Acrylamid

0,8 g N,N'-Methylenbisacrylamid

40,0 mg Bromphenolblau

25,0 ml Glycerin 87%

ad 100 ml Aqua bidest.

B Ammoniumpersulfat 40%

40 mg Ammoniumpersulfat in 1,0 ml Aqua bidest.
lösen.

C Gelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

18,17 g Tris

0,40 g SDS

0,01 g NaN_3

ad 100 ml Aqua bidest.

D Schwere Lösung

15,0 ml Lösung A

5,0 ml Lösung C

für 2 min entgasen, dann 20 μl Lösung B und 6 μl TEMED hinzufügen.

E Leichte Lösung

15,0 ml Aqua bidest.

5,0 ml Lösung C

für 2 min entgasen, dann 20 µl Lösung B und 6 µl
TEMED hinzufügen.

Zur Herstellung des Gels wurde mit gleichen Volumina schwerer und leichter Lösung mittels des Gradientenmischers ein ultradünnes Polyacrylamidgel auf die in der Polymerisationskuvette vorbereitete PAG-Folie gegossen. Dabei entstand durch Mischen der schweren mit der leichten Lösung ein konkav exponentieller Porengradient ($T = 4 - 22,5\%$).

Das Gradientengel wurde zum Polymerisieren über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann vor Gebrauch aus der Kuvette genommen.

2.2.13.2.4 Durchführung der Elektrophorese

Jeweils 5 µl der Proben und der Markersubstanzen wurden in die rechteckigen Vertiefungen (Slots) des Gels pipettiert, wobei die Verdünnungsreihe einer Probe nebeneinander aufgetragen, zwischen verschiedenen Proben und den Markern aber jeweils ein Slot freigelassen wurde, um Überlagerungen zu vermeiden.

Als Kathodenpuffer wurde 0,375 M Tris/Glycin (mit 0,1% SDS, 0,001% NaNa_3 , pH 8,3) und als Anodenpuffer 0,375 M Tris/Glycin (mit 16,3% Glycerin, 0,1% SDS, 0,001% NaNa_3 , pH 8,3) verwendet.

Der Elektrophoreselauf wurde mit einer Spannung von 600 V, einer Stromstärke von 50 mA und einer Leistung von 30 W in einer Laufzeit von 1,5 Stunden durchgeführt.

2.2.13.2.5 Silberfärbung nach Merril (24,36)

Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel für 30 min in 20%-iger Trichloressigsäure fixiert und anschließend 3 mal eine halbe Stunde in einem Gemisch aus 50% Methanol, 10% Eisessig und 40% Aqua bidest. gewaschen. Dann wurde unter gedämpftem Licht die Oxidation in 100 ml 0,0032 n Salpetersäure mit 0,1 g Kaliumdichromat durchgeführt. Anschließend wurde das Gel für 30 min in eine 0,5%-ige Silbernitratlösung gelegt.

Die Reduktion erfolgte mit 0,28 M Natriumbicarbonatlösung, die 250 µl Formalin pro 500 ml enthielt. Gestoppt wurde die Reaktion mit 5%-iger Essigsäure.

Zuletzt wurde das Gel noch 2 mal 10 min mit Aqua bidest. gewaschen, mit Cellophanpapier überzogen und getrocknet.

2.2.13.2.6 Auswertung der Elektrophorese

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Densitometers; die Molekulargewichte der einzelnen Proteinbanden wurden durch polynomiale Interpolation nach Newton (2) mittels eines Computerprogrammes berechnet.

2.2.14 Kohlenhydrataffinitätschromatographie

Der Nachweis evtl. vorhandener Kohlenhydrate erfolgte mit Hilfe der Affinitätschromatographie mittels Con A -Seph-rose (26).

2.2.14.1 Reagenzien und Geräte

- Con A - Sepharose 4 B, Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
- Trishydroxymethylaminomethan Tris, Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
- Natriumchlorid NaCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Salzsäure HCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Methyl- α -Glucopyranosid, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Glaswolle reinst, silanisiert, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg

2.2.14.2 Durchführung

Der Auslaß einer Pasteurpipette (Innendurchmesser 5,5 mm, Länge 70 mm) wurde mit silanisierter Glaswolle verstopft und 1,0 ml des Elutionspuffers (0,02 M Tris, 0,15 M NaCl, HCl ad pH 5,5) einpipettiert, um an der Pasteurpipette die 1,0 ml - Marke anzeichnen zu können. Nach Absaugen des Puffers wurde das Con A - Gel luftblasenfrei bis zur 1,0 ml - Marke eingelassen und mit der ca. 10-fachen Menge Puffer gespült.

Von dem radioaktiv markierten Material wurde 0,1 ml auf das Gel aufgetragen, mit dem Puffer eluiert und 8 Fraktionen zu je 1,0 ml gesammelt. Hierbei wurden von der Säule ungebundene Substanzen eluiert.

Ab der 9. Fraktion wurde zusätzlich zum obengenannten Puffer 0,5 M Methyl- α -Glucopyranosid als Elutionslösung verwendet, um von der Säule retiniertes Material zu eluieren. Hier wurden etwa 20 Fraktionen zu je 1,0 ml gesammelt. 0,1 ml jeder Fraktion wurden anschließend mit 5,0 ml Szintillationslösung versetzt und im Beta-Kanal des Betasint 5000 gemessen.

2.2.15 Gelchromatographie über Sephacryl S 1000

2.2.15.1 Reagenzien und Geräte

- Sephacryl S 1000, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Natriumchlorid NaCl, Fa. Merck, Darmstadt
- Dinatriumäthylendinitrilotetraessigsäure Na_2EDTA , Fa. Merck, Darmstadt
- Natriumazid NaN_3 , Fa. Merck, Darmstadt
- Phenylmethansulfonylfluorid PMSF, Fa. Merck, Darmstadt
- Szintillationslösung, Fa. Roth, Karlsruhe
- Glassäule 50 cm Länge x 1,5 cm Innendurchmesser, Fa. Bender und Hobein, München
- Fraktionskollektor Model 328, Fa. Instrumentation Specialties Co., Lincoln, Nebr., USA

- Zählröhrchen, Fa. W. Zinsser, Frankfurt
- Szintillationszähler Betaszint BF 5000, Fa. EF-Vertriebs-GmbH, München

2.2.15.2 Durchführung

Nach Auftragen von 1,0 ml der radioaktiven Probe erfolgte die Chromatographie wie unter Punkt 2.2.10 beschrieben. Es wurden 60 Fraktionen zu je 1,65 ml gesammelt und jeweils durch Entnahme eines Aliquots von 0,1 ml und Zugabe von 5,0 ml Szintillationslösung die Radioaktivität im Betaszint 5000 ermittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Protein- und Lipidkonzentrationen in Nativergüssen

3.1.1 Patienten mit benignen Grunderkrankungen

In der nachfolgenden Übersicht sind die Mittelwerte der Bestimmungen der Protein-, Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidkonzentrationen in den einzelnen Krankheitsgruppen dargestellt:

Diagnose	Protein [g/100ml]	Cholesterin [mg/100ml]	Triglyceride [mg/100ml]	Phospholipide [mg/100ml]
Herzinsuffizienz	1,6	26,2	23,2	34,4
Leberzirrhose	2,6	37,1	35,4	29,4
Pneumonie	4,4	100,4	148,2	51,3
Vasculitis allergica	2,1	41,0	84,4	24,3
Chronische Polyarthrit	4,4	116,0	39,0	86,7
Gesamtdurchschnitt	2,4	44,1	45,9	38,2

Eine genaue Aufschlüsselung der Werte mit Darstellung der Protein- und Lipidkonzentrationen jedes einzelnen Patienten ist aus Tabelle 1 Seite 38 zu ersehen.

3.1.2 Patienten mit malignen Grunderkrankungen

Hier wurden 3 Patienten (H.M., M.Hodgkin; M.E., Non-Hodgkin-Lymphom; S.M., Non-Hodgkin-Lymphom; in Tabelle 2 fettgedruckt) mit bereits makroskopisch deutlich chylösen Pleuraergüssen nicht in die Mittelwertsberechnung einbezogen; bei diesen Patienten war es offensichtlich infolge Arrosion größerer Lymphgefäße bereits zum Einstrom von Chylus in den Erguß gekommen.

In der folgenden Übersicht sind die Mittelwerte der Protein- und Lipidkonzentrationen dargestellt:

Diagnose	Protein [g/100ml]	Cholesterin [mg/100ml]	Triglyceride [mg/100ml]	Phospholipide [mg/100ml]
Mammacarcinom	4,2	67,7	55,0	60,6
Bronchialcarcinom	4,2	76,7	40,3	61,6
Hypernephrom	4,2	71,6	54,0	82,1
Non-Hodgkin-Lymphom	3,6	78,7	93,5	74,1
Hodgkin-Lymphom	2,8	64,1	75,8	64,2
Magen-/Darmcarcinom	3,7	82,0	45,0	70,8
Adenocarcinom der Lunge	4,2	112,9	51,2	84,5
Pleuramesotheliom	3,3	54,9	16,7	47,3
Thymom	4,0	61,4	35,2	57,0
Embryonales Hodencarcinom	3,9	53,3	17,7	47,5
Leiomyosarkom	5,8	119,9	62,4	94,3
Gesamtdurchschnitt	4,0	73,9	53,0	66,2

Tabelle 2 Seite 39 - 41 zeigt eine Übersicht der Einzelwerte.

3.1.3 Patienten mit tuberkulösen Grund-
erkrankungen

Es wurden folgende Mittelwerte errechnet:

Diagnose	Protein	Cholesterin	Triglyceride	Phospholipide
	[g/100ml]	[mg/100ml]	[mg/100ml]	[mg/100ml]
Lungentuberkulose	3,8	63,0	36,4	60,3

In Tabelle 3 Seite 42 sind wiederum die Einzelwerte sämtlicher Patienten dargestellt.

Tabelle 1:

Protein- und Lipidkonzentrationen in Pleuraergüssen benignen Genese

Diagnose	Name	Protein [g/100ml]	Cholesterin [mg/100ml]	Triglyceride [mg/100ml]	Phospholipide [mg/100ml]
Herzinsuffizienz					
	B. I.	1,3	18,8	20,8	27,5
	D. M.	1,3	21,3	16,0	21,4
	K. A.	2,0	23,9	10,4	34,4
	R. B.	3,4	58,0	44,7	60,6
	S. E.	1,0	18,8	19,8	41,3
	V. E.	0,7	18,8	18,6	16,3
	F. M.	2,0	33,0	27,0	22,8
	S. E.	1,8	29,0	30,2	62,6
	U. P.	0,9	14,5	21,0	22,8
Leberzirrhose					
	S. R.	3,0	49,1	33,3	40,0
	K. E.	2,7	25,7	30,5	20,5
	S. P.	2,2	36,6	42,3	27,8
Pneumonie					
	M. F.	3,8	76,8	200,2	15,1
	M. M.	5,0	124,1	96,2	87,4
Vasculitis allergica					
	Z. R.	2,1	41,0	84,4	24,3
Chronische Polyarthrit					
	R. J.	4,4	116,0	39,0	86,7

Tabelle 2:

Protein- und Lipidkonzentrationen in Pleuraergüssen maligner Genese

Diagnose	Name	Protein [g/100ml]	Cholesterin [mg/100ml]	Triglyceride [mg/100ml]	Phospholipide [mg/100ml]
Mammacarcinom					
	G.M.	2,3	34,1	13,3	35,7
	G.C.	4,4	67,8	24,0	64,7
	H.A.	3,8	87,4	36,4	68,1
	I.S.	3,8	64,0	53,2	50,0
	K.S.	3,8	70,0	28,6	60,6
	L.G.	4,2	86,2	26,0	72,3
	S.F.	2,9	53,7	32,2	49,5
	S.P.	3,7	64,0	39,9	42,9
	S.G.	4,5	29,9	6,7	28,6
	S.E.	4,8	78,5	78,5	64,7
	S.M.	3,6	76,1	42,6	70,9
	T.F.	3,8	81,0	279,3	102,9
	M.K.	4,4	104,1	35,4	72,9
	E.M.	4,6	52,0	62,5	45,9
	V.E.	3,4	60,4	48,8	45,4
	C.C.	7,1	82,1	58,9	51,3
	K.E.	4,7	82,9	43,1	67,2
	B.R.	2,2	46,2	56,9	24,6
	P.I.	4,8	64,1	58,5	51,5
	S.A.	3,4	53,9	46,9	46,4
	K.C.	3,0	55,6	38,2	48,9
	C.R.	3,4	61,6	56,9	67,3
	L.G.	8,6	103,7	107,2	67,3
	H.S.	7,9	95,8	80,9	76,7
	H.F.	4,1	51,3	46,6	68,3
	R.R.	2,5	49,7	35,3	86,3
	K.E.	2,7	40,0	29,2	84,9
	G.E.	4,8	100,2	73,2	81,4

Diagnose	Name	Protein [g/100ml]	Cholesterin [mg/100ml]	Triglyceride [mg/100ml]	Phospholipide [mg/100ml]
Bronchialcarcinom					
	B.J.	3,7	85,3	13,3	64,3
	H.R.	3,5	61,0	51,0	75,0
	H.A.	3,4	70,4	46,6	54,3
	M.E.	7,6	158,2	54,6	57,0
	S.M.	3,8	71,2	27,0	63,3
	D.G.	3,9	95,5	24,4	92,2
	E.J.	5,0	76,8	53,2	64,3
	G.H.	5,2	61,4	53,3	63,6
	L.H.	2,4	35,7	33,0	33,9
	J.K.	2,7	45,1	60,6	52,7
	A.K.	4,6	83,2	26,6	57,1
Hypernephrom					
	B.D.	4,9	83,2	39,9	71,4
	B.L.	2,6	53,7	39,0	61,9
	S.F.	6,4	106,6	66,5	128,6
	Z.G.	2,4	54,2	45,8	48,2
	E.L.	5,2	115,2	33,3	100,0
	O.G.	2,5	33,4	58,2	56,8
	S.J.	3,5	41,1	43,0	83,0
	R.X.	6,3	85,3	106,4	107,2
Non-Hodgkin-Lymphom					
	B.R.	3,3	64,4	221,5	123,9
	E.F.	2,7	51,2	73,2	7,1
	M.F.	4,4	93,8	52,0	74,3
	M.E.	2,9	106,2	2038,4	578,0
	S.M.	12,4	77,5	84,7	70,0
	S.J.	2,9	79,3	40,5	72,9
	K.H.	4,6	104,9	80,1	92,2

Diagnose	Name	Protein [g/100ml]	Cholesterin [mg/100ml]	Triglyceride [mg/100ml]	Phospholipide [mg/100ml]
Hodgkin-Lymphom					
	H.K.	2,9	55,5	99,8	71,4
	T.I.	3,9	96,0	63,8	64,3
	H.M.	2,5	64,4	830,3	122,0
	B.A.	2,3	53,9	78,4	64,9
	K.H.	1,9	51,2	61,4	56,1
Magen-/Darmcarcinom					
	B.A.	3,0	72,5	40,0	74,3
	G.H.	4,8	102,4	46,6	71,4
	G.E.	3,3	62,5	45,3	57,8
	S.A.	3,8	72,7	60,1	79,7
	W.E.	3,6	99,8	33,3	70,9
Adenocarcinom der Lunge					
	G.M.	4,7	103,6	33,8	86,0
	S.J.	4,6	108,3	39,5	79,8
	S.E.	4,5	130,1	79,8	92,9
	S.J.	3,0	94,3	40,6	63,3
	C.A.	4,3	128,4	62,4	100,5
Pleuramesotheliom					
	G.G.	3,9	74,6	23,4	63,3
	L.H.	2,2	34,7	13,3	35,7
	B.S.	3,7	55,5	13,3	42,9
Thymom					
	A.M.	4,1	63,1	17,2	64,0
	W.N.	4,0	59,7	53,2	50,0
Embryonales Hodencarcinom					
	D.P.	3,9	53,3	17,7	47,5
Leiomyosarkom					
	N.H.	5,8	119,9	62,4	94,3

Tabelle 3:

Protein- und Lipidkonzentrationen in Pleuraergüssen tuberkulöser Genese

Diagnose	Name	Protein	Cholesterin	Triglyceride	Phospholipide
		[g/100ml]	[mg/100ml]	[mg/100ml]	[mg/100ml]
Lungentuberkulose					
	D. J.	5,3	76,3	28,6	72,9
	K. D.	3,1	67,4	41,6	68,8
	N. A.	4,7	90,0	52,5	77,1
	S. H.	4,5	71,7	31,2	61,9
	H. H.	4,2	62,3	30,2	49,5
	G. B.	3,0	64,4	26,0	52,3
	Z. A.	3,0	41,0	33,2	40,8
	O. A.	2,9	30,5	48,2	59,0

3.2 Korrelationen der Protein- und Lipidkonzentrationen

In der folgenden Übersicht sind die Korrelationskoeffizienten der Protein- und Lipidkonzentrationen bezogen auf die jeweilige Ergußgenese dargestellt:

Gruppe	Pro/Cho	Pro/Tri	Pro/Pho	Cho/Tri	Cho/Pho	Tri/Pho
benigne	0,938	0,602	0,666	0,548	0,871	0,001
maligne	0,514	0,090	0,001	0,141	0,311	0,921
tuberkul.	0,742	-0,097	0,602	-0,011	0,690	0,476

Pro = Protein

Cho = Cholesterin

Tri = Triglyceride

Pho = Phospholipide

Die höchsten Korrelationswerte fanden sich zwischen Protein und Cholesterin.

Als Beispiel sei in Abb. 1 ein Korrelationsdiagramm Protein/Cholesterin aus Ergüssen benigner Genese dargestellt:

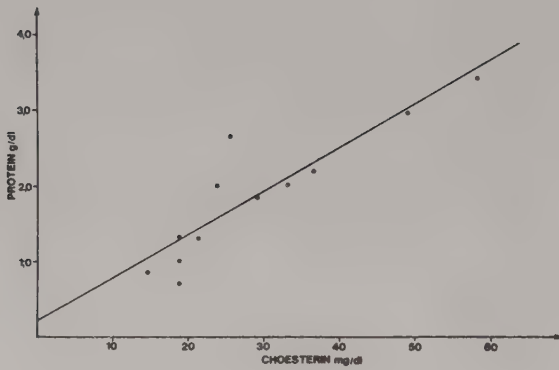


Abb. 1
Korrelation Protein/Cholesterin in Ergüssen benigner
Genese

3.3 Gelchromatographische Präparation der Ergüsse

3.3.1 Bestimmung des Ausschlußvolumens

Das Ergebnis der Bestimmung des Ausschlußvolumens der Biogel A 15m - Säule mit Hilfe des Farbstoffs Dextran 5000 ist in Abb. 2 graphisch dargestellt:

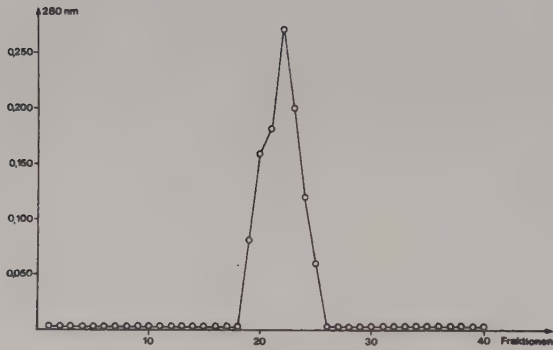


Abb. 2

Chromatographie von Dextran 5000 über Biogel A 15m

○—○ Extinktion bei 280 nm

Das Dextran sammelte sich in den Fraktionen 19 - 25 an und markierte somit das Ausschlußvolumen der Säule.

3.3.2 Säuleneichnung

Die nachfolgende Abb. 3 zeigt das Ergebnis eines Säulenlaufes mit radioaktiv markiertem Humanserum:

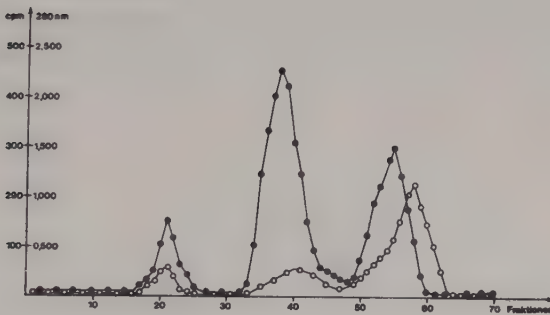


Abb. 3

Chromatographie von radioaktiv markiertem Humanserum über Biogel A 15m

- ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute
- Extinktion bei 280 nm

Entsprechend den Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL des menschlichen Plasmas stellten sich drei deutlich unterscheidbare Peaks mit gut korrelierenden Radioaktivitäts- und Proteinverteilungen dar. Das hochmolekulare VLDL wurde im Ausschlußvolumen der Säule eluiert, LDL und HDL wurden retiniert und entsprechend später wieder freigegeben. Durch Untersuchungen mit Hilfe der Immundiffusion nach Ouchterlony konnten erwartungsgemäß im ersten Peak Apoprotein A und B, im zweiten Peak Apoprotein B und schließlich im dritten Peak Apoprotein A nachgewiesen werden.

3.3.3 Gelchromatographie von Material aus Ergüssen benigner Genese

Ein typisches Chromatogramm eines entsprechenden Säulenlaufes ist in Abb. 4 dargestellt:

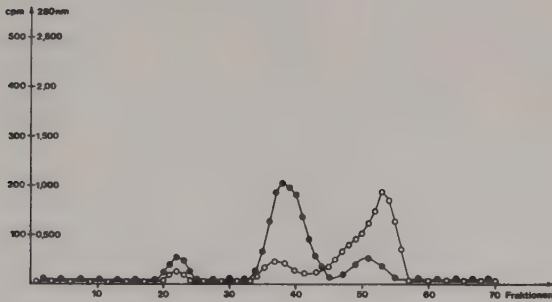


Abb. 4

Chromatographie von Material aus Pleuraergüssen benigner Genese über Biogel A 15m

●—● ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute

○—○ Extinktion bei 280 nm

Wiederum stellte sich ein dreigipfliger Kurvenverlauf dar. Durch Nachweis von Apoprotein B im zweiten und Apoprotein A im dritten Peak mittels der doppelten radialen Immundiffusion ließen sich diese Fraktionen als LDL und HDL identifizieren. Im hochmolekularen ersten Peak dagegen war keine entsprechende Reaktion zu beobachten; das Vorhandensein von VLDL konnte somit ausgeschlossen werden.

3.3.4 Gelchromatographie von Material aus Ergüssen maligner Genese

Abb. 5 zeigt einen entsprechenden Säulenlauf:

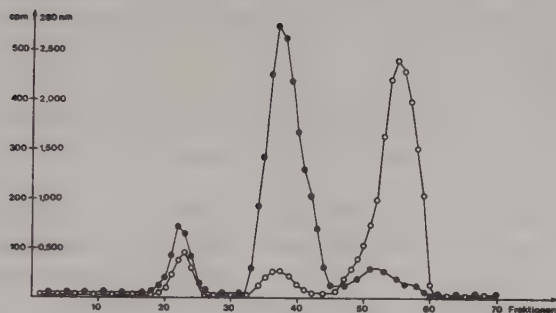


Abb. 5

Chromatographie von Material aus Pleuraergüssen maligner Genese über Biogel A 15m

●—● ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute

○—○ Extinktion bei 280 nm

Die Verteilung der drei Peaks entsprach dem bisher bekannten Muster; insgesamt lagen die Extinktions- und Radioaktivitätswerte jedoch höher als bei den benignen Ergüssen. Wiederum konnten durch immunologische Untersuchungen der zweite und dritte Peak als LDL und HDL identifiziert werden; in den drei erwähnten chylösen Pleuraergüssen ließ sich dagegen erwartungsgemäß im ersten präparierten Peak eine positive Reaktion gegen Anti-Apo A und Anti-Apo B als Hinweis auf das Vorhandensein von VLDL nachweisen.

3.3.5 Gelchromatographie von Material aus Ergüssen tuberkulöser Genese

Das Ergebnis der Chromatographie tuberkulös bedingten Materials unterschied sich qualitativ nicht wesentlich von den bisherigen Resultaten. Die Werte für Radioaktivität und Extinktion lagen höher als bei den benignen Ergüssen; bei den immunologischen Untersuchungen dagegen waren die Ergebnisse identisch ohne Nachweis von VLDL im ersten Peak.

3.4 Recovery-Ermittlung der Lipide und Proteine

Bei sämtlichen 32 durch Ultrafiltration und Gelchromatographie weiteruntersuchten Proben ist nach dem letzten Ultrafiltrationsschritt eine erneute Konzentrationsbe-

stimmung der Proteine und Lipide vorgenommen worden. Die Recovery für Proteine und Lipide betrug zwischen 35,3 und 82,4%, wobei der Hauptanteil der Verluste auf die Ultrafiltration zurückzuführen war. Die Ergüsse benigner Genese wiesen dabei eine etwas geringere Wiederfindungsrate auf als die maligne oder tuberkulös bedingten. Die einzelnen Werte sind der nachfolgenden Übersicht zu entnehmen:

	Recovery	
	Spannweite	Mittelwert
	[%]	[%]
Protein	41,3 - 82,4	51,3
Cholesterin	40,7 - 80,1	50,8
Triglyceride	38,9 - 79,5	49,0
Phospholipide	35,5 - 76,9	45,7

3.5 Biochemische Untersuchung des hochmolekularen Materials aus dem Ausschlußvolumen der Säulenchromatographie

3.5.1 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Das Ergebnis einer Ultrazentrifugation von Material aus dem ersten Chromatographiepeak eines Pleuraergusses maligner Genese mit Darstellung von Radioaktivität, Extinktion und Dichte der einzelnen Fraktionen zeigt die nachfolgende Abb. 6:

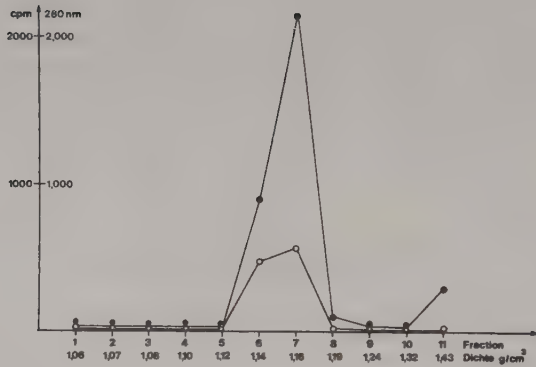


Abb. 6

Ultrazentrifugation von Material aus dem ersten Chromatographiepeak eines Pleuraergusses maligner Genese

●—● ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute

○—○ Extinktion bei 280 nm

Wie man sieht, baute sich während der 72-stündigen Ultrazentrifugation ein Dichtegradient von 1,06 bis 1,43 g/ml auf. Etwa in der Mitte der Zentrifugenröhrchen war bei vielen Proben bereits makroskopisch eine ca. 2 mm breite, opaleszierende Zone zu sehen; entsprechend konnte in den Fraktionen 6 und 7 bzw. im Dichtebereich 1,14 bis 1,16 g/ml ein beträchtlicher Anstieg der Radioaktivität und der Extinktion nachgewiesen werden. Dieser Peak konnte in sämtlichen untersuchten Proben beobachtet werden.

Ein weiterer Anstieg der Extinktion war in knapp der Hälfte der Proben zu sehen; dieser zweite Peak befand sich am Boden des Zentrifugenröhrchens in Fraktion 11. Er wies keine oder nur eine äußerst geringe Radioaktivität auf; seine Dichte betrug 1,43 g/ml. Durch Ouchterlony-Immundiffusion ließ sich in diesem Peak Albumin nachweisen.

Bei den drei chylösen Ergüssen setzte sich das VLDL nach der Ultrazentrifugation in Form eines flottierenden weissen Scheibchens an der Oberfläche der Proben ab; die vorher milchige Trübung dieser Proben war nach der Ultrazentrifugation verschwunden.

3.5.2 Quantitative Protein- und Lipidanalytik

Hier zeigten sich zwischen den insgesamt 32 Proben benignen, malignen und tuberkulöser Genese nur geringfügige Unterschiede; aus der nachfolgenden Übersicht ist die prozentuale Zusammensetzung des ersten Chromatographiepeaks zu ersehen:

	Spannweite [%]	Mittelwert [%]
Protein	55,8 - 79,3	68,0
Cholesterin	2,1 - 15,1	8,4
Triglyceride	6,4 - 24,6	14,5
Phospholipide	3,0 - 17,2	7,8

3.5.3 Qualitative Lipidanalytik

3.5.3.1 Lipiddünnschichtchromatographie

Die Ergebnisse einer dünnschichtchromatographischen Lipidauftrennung des hochmolekularen Materials aus Ergüssen benignen, malignen und tuberkulöser Genese sind in Abb. 7 dargestellt:

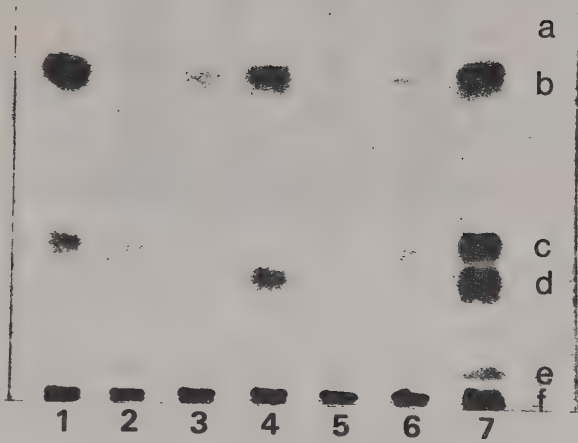


Abb. 7

Lipiddünnschichtchromatographie des hochmolekularen Materials

Nummer 1,2 und 5 stellen Proben benigner Genese dar; maligne Ergüsse wurden unter Nummer 3, 4, und 7 aufgetragen, und ein tuberkulös bedingter Erguß ist mit der Nummer 6 gekennzeichnet. Die mit a - f bezeichneten Banden repräsentieren folgende Lipidgruppen:

a	Cholesterinester
b	Triglyceride
c	Cholesterin
d	Diglyceride
e	Phospholipide
f	Monoglyceride

Interessanterweise war in sämtlichen Proben maligner Genese eine Bande im Bereich der Diglyceride zu sehen, die bei benignen oder tuberkulös bedingten Ergüssen ausnahmslos fehlte.

3.5.3.2 Phospholipiddünnschichtchromatographie

Abb. 8 zeigt das Ergebnis einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Phospholipide des ersten Säulenchromatographiepeaks in ihre Einzelkomponenten:

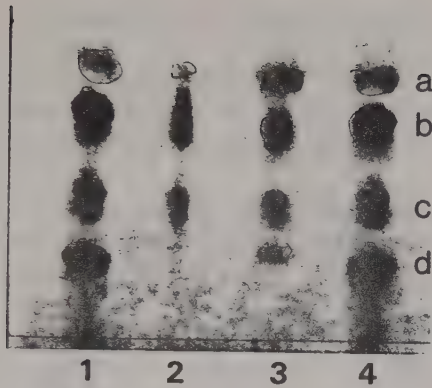


Abb. 8

Dünnschichtchromatographie der Phospholipide

Nummer 1 und 4 markieren die mitlaufenden Lipidstandards:

a	Phosphatidyläthanolamin
b	Phosphatidylcholin
c	Sphingomyelin
d	Phosphatidylinositol.

Unter Nummer 2 wurde ein benigner und bei 3 ein maligner Erguß aufgetragen.

Wiederum fand sich bei Material maligner Genese eine zusätzliche Lipidbande, hier im Bereich des Phosphatidylinositols, die in Proben benigner oder tuberkulöser Genese nicht nachzuweisen war.

3.5.4 Immundiffusion nach Ouchterlony

Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde das durch Säulenchromatographie gewonnene Material gegen Anti-Humanserum, Anti-Humanalbumin, Anti-Apoprotein A und Anti-Apoprotein B getestet.

Wie bereits erwähnt, konnten auf diese Weise der zweite und dritte Chromatographiepeak als LDL und HDL identifiziert werden (Abb. 9 und 10):

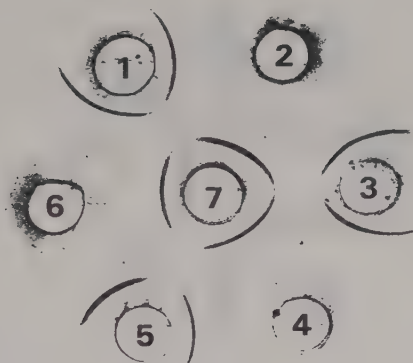


Abb. 9

Immundiffusion von Material des zweiten Peaks (1,3,5,7)
gegen Anti-Apoprotein B (2,4,6)

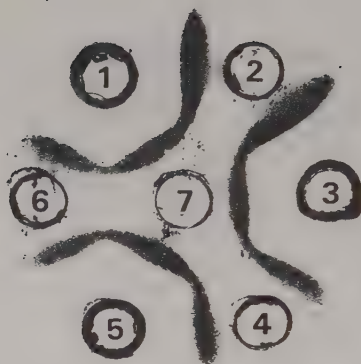


Abb. 10

Immundiffusion von Material des dritten Peaks (2,4,6,7)
gegen Anti-Apolipoprotein A (1,3,5)

Bei der Untersuchung des ersten Peaks fand sich in etwa
der Hälfte der Proben eine positive Reaktion gegen Anti-

Humanalbumin. In diesen Fällen zeigten sich auch jeweils singuläre Präzipitationslinien bei der Immundiffusion gegen Anti-Humanserum, sodaß als einziger Serumbestandteil Albumin in ca. 50% der Proben nachzuweisen war. Lediglich die drei bereits erwähnten chylösen Ergüsse reagierten positiv bei der Immundiffusion gegen Anti-Apoprotein A und Anti-Apoprotein B als Zeichen der Kontamination mit VLDL. Nach Zwischenschaltung der Ultrazentrifugation als weiterem Reinigungsschritt jedoch gelang die vollständige Entfernung des VLDL; die entsprechenden immunologischen Tests blieben negativ.

3.5.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

3.5.5.1 Material aus Ergüssen benigner Genese

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine des hochmolekularen Materials benigner Genese aus dem Ausschlußvolumen der Säulenchromatographie konnten Banden folgenden Molekulargewichts dargestellt werden:

25.100

32.800

45.000

54.600.

Die Abweichungen der einzelnen ermittelten Molekulargewichtswerte vom Durchschnitt betrugen hierbei maximal 1,8%.

3.5.5.2 Material aus Ergüssen maligner Genese

Als Beispiel ist in Abb. 11 der Elektrophoreselauf eines Pleuraergusses maligner Genese dargestellt:

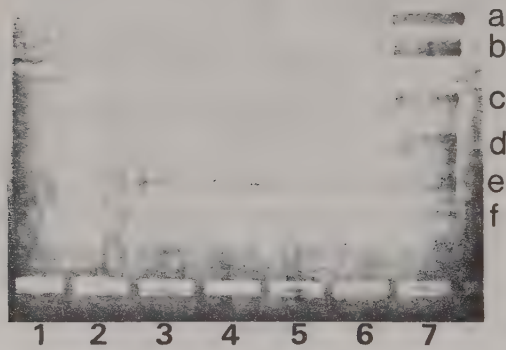


Abb. 11

Elektrophorese des hochmolekularen Materials eines Pleuraergusses maligner Genese

Unter 1 - 5 ist die zu untersuchende Probe in einer absteigenden Verdünnungsreihe aufgetragen; Spalte 7 enthält Markerproteine folgenden Molekulargewichts:

a	14.400
b	20.100
c	30.000
d	43.000
e	67.000
f	94.000.

Bei der Auswertung der Elektrophoresen konnten Proteinbanden folgenden Molekulargewichts errechnet werden:

32.800
36.700
42.200
45.000
54.600
59.000
70.900
83.200
93.700
102.600
107.900.

Die Abweichung der Einzelwerte vom Durchschnitt betrug bei den malignen Ergüssen maximal 2,7%.

Auffällig war die erheblich höhere Anzahl der Proteinbanden gegenüber den Ergüssen benigner Genese; die Proteine

des Molekulargewichts 32.800, 45.000 und 54.600 konnten sowohl bei benignen wie bei malignen Ergüssen beobachtet werden.

3.5.5.3 Material aus Ergüssen tuberkulöser Genese

Die Elektrophorese tuberkulös bedingten Materials zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber den Proben benigner Genese; es konnten dieselben Proteinbanden wie unter Punkt 3.4.5.1 beschrieben dargestellt werden.

3.5.6 Kohlenhydrataffinitätschromatographie

Das Ergebnis einer Affinitätschromatographie des hochmolekularen Materials über Con A - Sepharose 4B ist in Abb. 12 dargestellt:

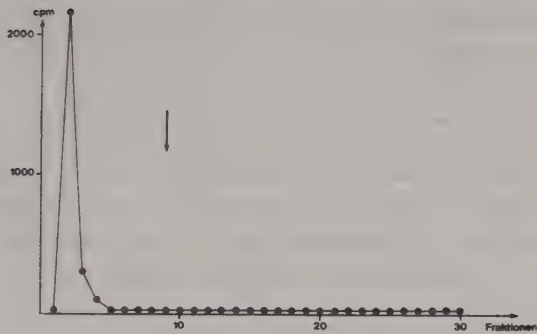


Abb. 12

Kohlenhydrataffinitätschromatographie über Con A - Sepharose 4B; der Pfeil markiert die Zugabe der Elutionslösung.

●—● ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute

Wie man sieht, wurde das gesamte radioaktiv markierte Material bereits durch den einfachen Elutionspuffer von der Säule gewaschen; es erfolgte keinerlei Adsorption, sodaß allenfalls nur sehr geringe Kohlenhydratmengen Bestandteil der untersuchten Substanz sein können. Diese Ergebnisse wurden bei sämtlichen untersuchten Proben gewonnen, unabhängig von einer benignen, malignen oder tuberkulösen Genese.

3.5.7 Gelchromatographie über Sephacryl S 1000

Die Gelchromatographie über Sephacryl S 1000, einem Material mit einer Ausschlußgrenze von 100 Mio. Dalton, diente der näheren Untersuchung des Molekulargewichtes der säulenchromatographisch gewonnenen hochmolekularen Substanz.

In Abb. 13 ist die gemessene Radioaktivitätsverteilung nach einem entsprechenden Säulenlauf graphisch dargestellt:

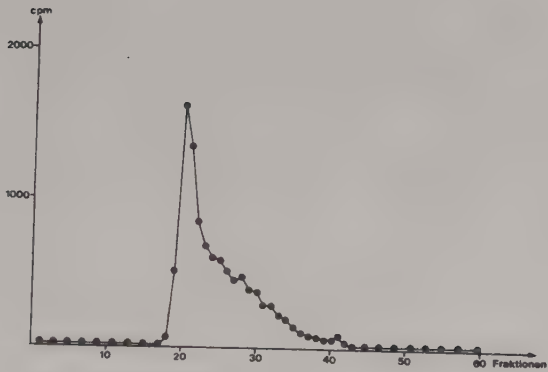


Abb. 13

Gelchromatographie über Sephacryl S 1000

●—● ^3H -Cholesterin-Impulse pro Minute

Bei der Auswertung zeigte sich ein steil ansteigender Peak ab Fraktion 19, der dann ab Fraktion 23 langsam über etwa 15 weitere Fraktionen hin zur Basisaktivität abfiel. Da der linksseitig scharf abgrenzbare Peak nicht im Ausschlußvolumen der Säule eluiert wurde, das etwa die Fraktionen 0 - 15 umfaßte, mußte sein Molekulargewicht gering unter 100 Mio. Dalton liegen. Die langsam abfallende Flanke des Peaks wies auf eine relativ breite Molekulargewichtsverteilung der untersuchten Probe hin.

Entsprechende Kurven wurden bei sämtlichen Ergüssen gewonnen, ohne daß ein Unterschied zwischen benigne, maligne oder tuberkulös bedingtem Material festgestellt werden konnte.

4. DISKUSSION

4.1 Patientengut

Die Pleuraergüsse benigner Genese wurden von Patienten mit Herzinsuffizienz, Leberzirrhose, Pneumonie, Vasculitis allergica und Chronischer Polyarthritits gewonnen. In all diesen Fällen war eine akute Entlastung aufgrund der Ergußmenge indiziert gewesen; ein Malignomverdacht bestand bei keinem dieser Patienten.

Die geringere Fallzahl gegenüber den Patienten mit malignen Grunderkrankungen ist damit zu erklären, daß gutartige Ergüsse heutzutage oft nicht mehr punktiert werden, sondern meist durch Diuretikagabe ausreichend therapiert werden können.

Die Pleuraergüsse maligner Genese stammten von Patienten mit fortgeschrittenen bösartigen Erkrankungen; hier war es meist infolge einer Pleuritis carcinomatosa zu Pleuraergüssen gekommen.

Eine Sonderstellung nahmen drei makroskopisch milchig getrühte Ergüsse von Patienten mit M. Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphomen ein, bei denen es durch Arrosion von Lymphgefäßen zum Einstrom chylushaltiger Flüssigkeit in den Pleuraerguß gekommen war. Aufgrund der überhöhten Lipidkonzentrationen durch Kontamination mit Chylomikronen mußten diese Ergüsse von der Durchschnittsberechnung

der quantitativen Protein- und Lipidanalytik ausgenommen werden.

Bei den tuberkulösen Ergüssen handelte es sich um Zufallsbefunde im Rahmen der allgemeinen Ergußdiagnostik; in keinem der Fälle konnten Tuberkelbakterien im Pleuraerguß gefunden werden; die Diagnose stützte sich auf klinische und radiologische Befunde sowie den mikroskopisch, kulturell oder im Tierversuch verifizierten Nachweis von Tuberkelbakterien in Sputum und Magennüchternsekret.

4.2 Methodik

4.2.1 Vorbereitung des Probenmaterials

Durch die sofortige Verarbeitung oder das Tiefgefrieren der Punktate und den Zusatz von Natriumazid und Phenylmethansulfonylfluorid wurde versucht, eine Denaturierung der untersuchten Inhaltsstoffe möglichst gering zu halten. Natriumazid diente vorwiegend der Verhinderung mikrobiellen Wachstums, während Phenylmethansulfonylfluorid zur Hemmung von Proteasen und Peptidasen zugesetzt wurde. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen wurde vermieden; konnte eine Probe nach dem Auftauen nicht verarbeitet werden, wurde sie verworfen. Bei einmaligem Tiefgefrieren und schonendem Auftauen ließ sich bei der Weiterverarbeitung keine Veränderung des Materials gegenüber den sofort verarbeiteten Proben erkennen.

4.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Lowry durchgeführt (22). Diese Methode ist wesentlich empfindlicher als die allgemein übliche Biuret-Reaktion, was vor allem bei den relativ niedrigen Proteinkonzentrationen der benignen Proben von Bedeutung war.

4.2.3 Lipidbestimmungen

Die Ermittlung der Konzentrationen von Cholesterin, Triglyceriden und Phospholipiden wurde mit Testkits der Firma Boehringer, Mannheim, bzw. der Fiske-Subbarow-Methode vorgenommen. Die Bestimmungen ließen sich ohne Schwierigkeiten durchführen; lediglich in einigen Fällen war es nötig, aufgrund der teilweise sehr niedrigen Lipidkonzentrationen bei der Bestimmung ein mehrfaches des angegebenen Probenvolumens zu verwenden, was jedoch anschließend durch einen entsprechend geänderten Multiplikationsfaktor rechnerisch wieder ausgeglichen wurde. Die bei den Bestimmungen mitgeführten Kontrollseren lagen mit ihren Werten immer im Vertrauensbereich.

4.2.4 Inkubation mit radioaktivem Tracer

Die Zugabe von radioaktiv markiertem Cholesterin diente der Markierung und dem Nachweis selbst geringster Mengen von Cholesterin in der zu untersuchenden Probe. Der zugegebene Tracer stand bei der Inkubation im Austausch mit

freiem Cholesterin; durch einfache Radioaktivitätsmessung im Szintillationszähler konnte somit die Cholesterinverteilung nach chromatographischer Probenauftrennung ermittelt werden.

4.2.5 Säulenchromatographie über Biogel A 15m

Die Gelchromatographie mit Biogel A 15m zeichnete sich durch hohe Trennschärfe und gute Reproduzierbarkeit aus. Lediglich bei Überladung der Säule mit Proben zu hoher Proteinkonzentration gab es Überlappungen zwischen dem zweiten und dritten Peak; diese Säulenläufe wurden dann mit einer geringeren Probenkonzentration wiederholt. Das auf die Geloberfläche gelegte Papierfilter verhinderte etwaige Verunreinigungen des Gels. Die nach jedem Lauf durchgeführte Spülung der Säule mit Elutionslösung hatte zum Ziel, eventuell noch retinierte Restsubstanzen zu eliminieren, die weder anhand der Radioaktivitätsmessung noch der Photometrie faßbar waren.

4.2.6 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Zur Ermittlung der optimalen Dichte der Ausgangslösung waren einige Vorversuche erforderlich; schließlich erwies sich dann eine Cäsiumchloriddichte von 1,25 g/ml als günstig.

Während der 72-stündigen Inkubation bildete sich in der zuvor homogenen Lösung ein Dichtegradient von 1,06 bis

1,43 g/ml. Die eingebrachten Substanzen reicherten sich somit im jeweiligen Dichtebereich an.

Leider stand ein Refraktometer zur Dichtebestimmung der einzelnen Fraktionen nicht zur Verfügung; es mußte daher durch Abwiegen genau definierter Volumina die Dichte ermittelt werden.

4.2.7 Qualitative Lipidanalytik

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide und Phospholipide war entsprechend der angegebenen Methodik problemlos durchzuführen; lediglich das Auftragen der Proben erwies sich insofern als diffizil, als einerseits die Probe in Form einer schmalen Bande aufgestrichen werden sollte, andererseits eine Beschädigung der Kieselgel-Oberfläche der Platten unbedingt vermieden werden mußte.

4.2.8 Immundiffusion nach Ouchterlony

Die doppelte radiale Immundiffusion nach Ouchterlony stellte ein einfach zu handhabendes Verfahren dar; beim Gießen der Gele mußte streng auf eine waagrechte Oberfläche geachtet werden, um Unregelmäßigkeiten bei der anschließenden Diffusion zu vermeiden.

4.2.9 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Verwendung ultradünner Porengradientengele ermöglichte die elektrophoretische Auftrennung auch geringster Proteinmengen.

Die Durchführung der Elektrophorese bereitete keine Schwierigkeiten; lediglich bei der anschließenden Färbung erwies sich in den Vorversuchen die Empfindlichkeit der herkömmlichen Färbeverfahren mit Hilfe von Coomassie Brilliant Blue als zu gering. Daher wurde die Silberfärbung nach Merril verwendet, die als hochsensible Methode bekannt ist, jedoch bei der Färbung einige Banden doppelkonturierte. Die teilweise recht ausgeprägte Hintergrundfärbung der Merril-Methode erschwerte zudem in etlichen Fällen die Auswertung der Elektropherogramme mit Hilfe der Densitometrie.

Die Molekulargewichte der einzelnen Proteinbanden wurden mittels eines Computerprogramms durch polynomiale Interpolation nach Newton errechnet, wobei die absoluten Laufweiten der Referenzsubstanzen die Stützpunkte eines Polynoms 5. Ordnung bildeten. Diese Methode ermöglichte eine hohe Reproduziergenauigkeit der Elektrophorese mit Absolutabweichungen von maximal 2,7%.

4.2.10 Kohlenhydrataffinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie über Con A - Sepharose ermöglicht den Nachweis endständig D-Mannosyl- oder D-

Glucosyl-enthaltender Stoffe. Sicherheitshalber wurden nach Zugabe des Methyl- α -Glucopyranosid enthaltenden Elutionspuffers nicht nur 10, sondern mehr als 20 Fraktionen gesammelt, um eine verspätete Elution eventuell retinierter Kohlenhydrate erkennen zu können; es ergab sich jedoch kein Hinweis auf das Vorhandensein von Kohlenhydraten in den untersuchten Proben.

4.2.11 Gelchromatographie über Sephacryl S 1000

Das verwendete Acrylatgel erwies sich als sehr unempfindlich gegenüber einer Probenüberladung durch zu hohe Proteinkonzentration oder der Verwendung eines hohen Elutionsdruckes; anfängliche Schwierigkeiten bei Benutzung eines Dextrangels mit Zusammensinterung des Gelbettes und inakzeptabler Verminderung der Elutionsgeschwindigkeit konnten auf diese Weise umgangen werden.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Protein- und Lipidkonzentrationen in Nativergüssen

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der mittleren Protein-, Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidkonzentrationsbestimmungen in Nativergüssen fiel eine deutlich höhere Protein- und Lipidkonzentration in Ergüssen maligner

ner und tuberkulöser Genese auf; innerhalb der Gruppe der benignen Ergüsse fanden sich interessanterweise ebenfalls erhöhte Protein- und Lipidwerte in den entzündlich bedingten Ergüssen der Krankheitsgruppen Pneumonie, Vasculitis allergica und Chronische Polyarthritits. Besonders regelmäßig ließ sich die erhöhte Lipidkonzentration beim Cholesterin nachweisen, während Triglyceride und Phospholipide größeren Schwankungsbreiten unterworfen waren, wie aus den Tabellen 1 - 3 Seite 38 - 42 zu entnehmen ist.

Legt man daher die Protein- und Cholesterinkonzentration der Pleuraergüsse als Parameter zugrunde, erscheint es sinnvoller, eine Einteilung der Ergüsse entsprechend einer gutartigen, entzündlichen oder malignen Genese vorzunehmen, wie in der folgenden Übersicht dargestellt:

Genese	Protein [g/100ml]	Cholesterin [mg/100ml]
gutartig	1,9	29,0
entzündlich	3,8	71,8
maligne	4,1	74,3

Die Werte jeder einzelnen Bestimmung sind in den nachfolgenden Abbildungen in Form von Punktediagrammen graphisch dargestellt:

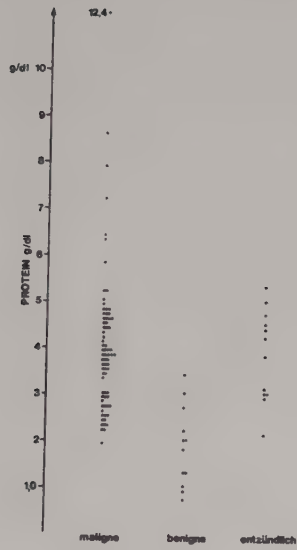


Abb. 14

Darstellung der Proteinkonzentrationen in Ergüssen gutar-tiger, entzündlicher und maligner Genese

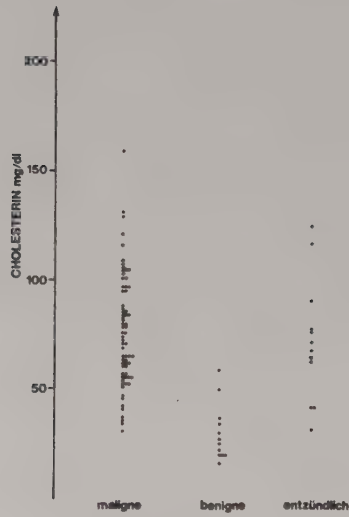


Abb. 15

Darstellung der Cholesterinkonzentrationen in Ergüssen gutartiger, entzündlicher und maligner Genese

Es ist bereits seit längerem bekannt, daß erhöhte Protein- und Lipidkonzentrationen in Pleuraergüssen entzündlicher oder maligner Genese zu finden sind (17,19,33). Läßt sich daher bei Nachweis einer entsprechend erhöhten Protein- oder Cholesterinkonzentration durch andere Untersuchungen eine entzündliche Ursache ausschließen, muß der dringende Verdacht auf das Vorliegen einer malignen Grunderkrankung erhoben werden.

4.3.2 Korrelationen der Protein- und Lipidkonzentrationen

Die Bestimmung der Korrelationskoeffizienten zwischen Protein- und Cholesterinkonzentrationen ergab Werte, die zumeist deutlich höher lagen als die Koeffizienten zwischen den übrigen untersuchten Bestandteilen; die bereits im vorigen Punkt erwähnte gleichsinnige Erhöhung der Protein- und Cholesterinkonzentrationen in Ergüssen entzündlicher und maligner Genese spricht ebenfalls für ein relativ konstantes Protein-/Cholesterinverhältnis, während Triglyceride und Phospholipide offensichtlich mit sehr unterschiedlichem Prozentsatz an der Zusammensetzung beteiligt sind.

4.3.3 Gelchromatographische Präparation der Ergüsse

In sämtlichen untersuchten Proben konnte eine dreigipflige Verteilung der Protein- und Cholesterinkonzentration beobachtet werden, wobei der zweite und dritte Peak sich als LDL und HDL identifizieren ließen. Die dagegen im Ausschlußvolumen der Säule laufenden Fraktionen mit Molekulargewichten über 15 Mio. Dalton waren das Ausgangsmaterial für weitere eingehende biochemische Untersuchungen.

4.3.4 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte eine Dichte der untersuchten Substanz von 1,15 g/ml ermittelt werden. Außerdem gelang durch die Ultrazentrifugation die Abtrennung von VLDL in den mit Chylus kontaminierten Proben.

4.3.5 Quantitative Protein- und Lipidanalytik

Es konnte eine prozentuale Zusammensetzung mit 69% Protein, 8% Cholesterin, 15% Triglyceriden und 8% Phospholipiden ermittelt werden.

4.3.6 Qualitative Lipidanalytik

Als besonders bemerkenswertes Ergebnis konnte festgestellt werden, daß ausschließlich in Proben maligner Ge-

nese bei der Lipiddünnschichtchromatographie eine Bande im Bereich der Diglyceride sowie bei der Phospholipid-dünnschichtchromatographie eine Bande im Bereich des Phosphatidylinositols nachzuweisen war.

4.3.7 Immundiffusion nach Ouchterlony

Wie bereits erwähnt, konnten mit Hilfe der Immundiffusion im zweiten und dritten Peak der Gelchromatographie LDL und HDL nachgewiesen werden. Im ersten Peak dagegen wurde als einziger Serumbestandteil in etwa 50% der Fälle Albumin gefunden; lediglich die chylösen Ergüsse enthielten erwartungsgemäß VLDL.

4.3.8 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Elektrophorese diente der weiteren Auftrennung der Proteine in ihre Untereinheiten. Es konnten in Proben benigner und tuberkulöser Genese 4, in malignen Ergüssen bis zu 11 verschiedene Proteinbanden dargestellt werden, wobei drei Banden sowohl bei benignen und tuberkulösen als auch bei malignen Proben gefunden wurden.

4.3.9 Kohlenhydrataffinitätschromatographie

Das gesamte radioaktiv markierte Material wurde ohne Retention von der Säule gewaschen; es konnten somit keine Kohlenhydrate mit D-Mannosyl- oder D-Glucosyl-Resten nachgewiesen werden.

4.3.10 Gelchromatographie über Sephacryl S 1000

Der steil ansteigende Peak zeigte ein Maximum im Molekulargewichtsbereich gering unter 100 Mio. Dalton; allerdings mußte aufgrund der sehr langsam abfallenden Flanke des Peaks eine breite Molekulargewichtsverteilung angenommen werden.

5.

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Pleuraergüsse wurden seit Ende des letzten Jahrhunderts mit verschiedenen Methoden untersucht; so stellen die Bestimmung des spezifischen Gewichts oder die Rivalta-Probe bekannte Verfahren zur weiteren Charakterisierung der Ergüsse dar.

Nachdem in Pleuraergüssen entzündlicher oder maligner Genese erhöhte Protein- und Lipidwerte festgestellt werden konnten (17,19,33), konzentrierte sich das Interesse auf die nähere Untersuchung der Proteine und Lipide; in der vorliegenden Arbeit wurden die Ergüsse mittels verschiedener biochemischer Verfahren einer eingehenden Analyse unterzogen.

Bestimmungen der Konzentrationen an Protein, Cholesterin, Triglyceriden und Phospholipiden bestätigten die erhöhten Protein- und Lipidwerte in entzündlich oder maligne bedingten Pleuraergüssen, wobei vor allem Proteine und Cholesterin ein gleichsinniges Verhalten zeigten.

Mit Hilfe gelchromatographischer Verfahren konnte eine Trennung in drei protein- und lipidhaltige Fraktionen vorgenommen werden. Auch hier fand sich eine enge Korrelation zwischen Protein- und Cholesterinkonzentration, sodaß auf das Vorliegen von Lipoproteinkomplexen geschlossen werden mußte. Der zweite und dritte Chromatographiepeak wurden schließlich durch immunologische Un-

tersuchungen als LDL und HDL identifiziert, während im ersten Peak als einziger Serumbestandteil in der Hälfte der Fälle Albumin nachgewiesen werden konnte.

Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich dann auf diesen hochmolekularen Lipoproteinkomplex aus dem Ausschlußvolumen der Säulenchromatographie:

So wurde mit Hilfe der Ultrazentrifugation die Dichte zu 1,15 mg/ml bestimmt; die Zusammensetzung konnte zu 69% Protein, 8% Cholesterin, 15% Triglyceriden und 8% Phospholipiden ermittelt werden.

Eine genauere Analyse der Lipide zeigte bemerkenswerterweise Phosphatidylinositol und Diglyceride ausschließlich in Material aus Ergüssen maligner Genese.

Bei der Elektrophorese schließlich konnten ebenfalls zusätzliche Proteinbanden nachgewiesen werden, die nur in malignen Ergüssen zu beobachten waren.

Die Kohlenhydrataffinitätschromatographie ergab keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Kohlenhydraten in dem untersuchten Material.

Die analytische Chromatographie über ein Gel hoher Ausschlußgrenze zeigte eine relativ breite Molekulargewichtsverteilung mit einem Maximum bei etwa 90 Mio. Dalton.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Ergebnisse lassen sich daher die eingangs gestellten Fragen wie folgt beantworten:

1. Lipide und Proteine liegen in Pleuraergüssen in Form von Lipoproteinkomplexen vor.

2. An plasmatischen Lipoproteinen wurden LDL und HDL sowie in den seltenen Fällen einer Lymphgefäßarrosion auch VLDL gefunden; es konnte jedoch ein weiterer, bisher unbekannter Lipoproteinkomplex beobachtet werden, der in etwa der Hälfte der untersuchten Proben als einzigen Serumbestandteil Albumin aufwies. Dieser hochmolekulare Komplex wurde mit verschiedenen biochemischen Verfahren näher untersucht und charakterisiert.
3. Die früheren Beobachtungen erhöhter Protein- und Lipidkonzentrationen in Ergüssen entzündlicher und maligner Genese konnten bestätigt werden; in dem erwähnten hochmolekularen Lipoproteinkomplex wurden darüber hinaus in elektrophoretischen und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen kennzeichnende Merkmale maligner Ergüsse gefunden.
4. Während bei LDL, HDL und gegebenenfalls VLDL eine Herkunft aus dem Blutplasma anzunehmen ist (3), scheint dies für den beobachteten hochmolekularen Lipoproteinkomplex nicht zuzutreffen. Weitergehende Untersuchungen wie z.B. die Fluoreszenzmikroskopie an Gewebsschnitten werden nähere Aufschlüsse über die Herkunft dieses Lipoproteins geben können.

6.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Berson, S.A., Yalow, R.S.:
J. clin. Invest. 33, 377 (1954)
2. Bibliographisches Institut Mannheim:
Interpolation.
Meyers Großer Rechenduden, Dudenverlag (1964)
3. Blumenstingl, J.:
Zur biochemischen Charakterisierung und Darstellung von LSP und KSP.
Inauguraldissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1984)
4. Böhle, E., Schmitt, A.:
Chemische und elektrophoretische Untersuchungen der Lipide von Pleura- und Peritonealergüssen verschiedener Ätiologie.
Z. klin. Med. 154, 358-377 (1957)
5. Carr, D.T., Power, M.H.:
Clinical value of measurements of concentration of protein in pleural fluid.
New Engl. J. Med. 259, 926-927 (1958)

6. Emmrich, R.:
Untersuchungen über die Differenzierung von Exsudaten und Transsudaten.
Z. ges. Inn. Med. 19, 8-12 (1964)
7. Emmrich, R., König, S.:
Über die Differenzierung von Exsudat und Transsudat.
Med. Klin. 56, 661-664 (1961)
8. Felder, O.:
Über die Möglichkeit einer elektrophoretischen Differenzierung der Pleuraexsudate, zugleich ein Beitrag zur Frage der Eiweißsubstitutionsbehandlung.
Munch. Med. Wschr. 95, 928-931 (1953)
9. Fehrström, H., Moberg, U.:
SDE and Conventional Polyacrylamide Gel Electrophoresis with LKB 2117 Multiphor.
LKB Application Note 306 (1977)
10. Fiske, C.H., Subbarow, Y.P.:
The colorimetric Determination of Phosphorous.
J. Biol. Chem. 64, 375-400 (1925)

11. Foreman, J.R., Karlin, J.B., Edelstein, C., Juhn, J.Y., Rubenstein, A.H., Scann, A.M.:
Fractionation of human serum lipoproteins by single-spin gradient ultracentrifugation: qualification of apolipoproteins B and A-I and lipid components.
J. Lip. Res. 18, 759 (1977)
12. Fuchs, G.:
Elektrophoretische Untersuchungen zur Exsudatbildung in serösen Höhlen.
Klin. Wschr. 34, 1231-1236 (1956)
13. Görg, A., Postel, W., Westermeyer, R.:
One and Two Dimensional Electrophoresis performed horizontally in ultrathin SDS pore-gradient gels.
LKB Application Note 320, LKB-Produkter AB S-161 26 Bromma Sweden (1981)
14. Gofman, J.W., Lindgren, F.T., Elliot, H.A.:
Ultracentrifugal studies of Lipoproteins of human serum.
J. Biol. Chem. 179, 973 (1949)

15. Griffith, O.M.:
Techniques of preparative zonal and continuous
flow ultracentrifugation.
Applications Research Department, Spinco Division,
Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Calif., 5
(1976)
16. Jüngst, D.:
Cholesterin im Urin - Grundlagen und klinische Be-
deutung.
Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universi-
tät München (1982)
17. Keller, C.:
Die Differentialdiagnose der Pleurahöhlenergüsse
anhand einfacher Labormethoden.
Münch. Med. Wschr. 97, 388-392 (1955)
18. Keller, C.:
Untersuchungen zur klinischen Chemie der Pleura-
höhlenergüsse. Erste Mitteilung: Elektrophorese,
N-Fractionen, Labilitätsproben.
Dtsch. Arch. klin. Med. 201, 136-157 (1954)
19. Kuntz, E.:
Der Pleuraerguss.
Urban & Schwarzenberg, München - Berlin - Wien
(1968)

20. Leckie, W.J.H., Tothiel, P.:
Albumin turnover in pleural effusions.
Clin. Sci. 29, 339-352 (1965)
21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis-Farr, A.,
Randall, R.J.:
Protein Measurement with the Folin-Phenol-Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
22. Mangold, H.K., in Stahl, E.:
Dünnschichtchromatographie.
S. 371 ff, Springer-Verlag Heidelberg 2. Aufl.
(1967)
23. Martin, R.:
Zur diagnostischen Bedeutung von Cholesterin, Tri-
glyceriden, Phospholipiden und Protein in Aszites.
Inauguraldissertation, Ludwig-Maximilians-Univer-
sität München (1983)
24. Merrill, C.R., Goldmann, D., van Keuren, M.L.:
Simplified silver protein detection and image en-
hancement method in polyacrylamide gels.
Electrophoresis 3, 17-23 (1982)

25. Ouchterlony, D.:
Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis.
Ann Arbor Science Publisher, Ann Arbor, M. 21
(1969)
26. Pharmacia Fine Chemicals:
Affinity Chromatographie, principles and methods.
S. 52-57
27. Pieper, J., Heine, F.:
Vergleichende Untersuchungen von Blut und Pleura-
exsudat mittels Elektrophorese und Erythrozyten-
senkung.
Klin. Wschr. 34, 595-598 (1956)
28. Reckert, H., Schneider, P.:
Berechnung vom Cäsiumchloridgradienten bei isopyk-
nischer Ultrazentrifugation.
In: Bedienungsanleitung für Hochleistungsrotor 60
Ti der Fa. Beckman Instr. Inc., Palo Alto, Calif.,
USA
29. Reinhardt, F., Auerswald, W., Doleschel, W.:
Zur Frage der Proteinverteilung in extravasalen
Flüssigkeiten.
Z. Inn. Med. 39, 238-241 (1958)

30. Reuss, A.:
Beiträge zur klinischen Beurteilung von Exsudaten
und Transsudaten.
Dtsch. Arch. Klin. Med. 24, 583 (1879) und
28, 317 (1881)
31. Röschlau, B., Bernt, E., Gruber, W.:
Cholesterol.
9th Int. Cong. on Clin. Chemistry, Toronto, Abstr.
No. 1 (1975)
32. Schettler, G.:
Innere Medizin, Band II, 5. Auflage, S. 68
Thieme-Verlag, Stuttgart - New York (1980)
33. Schwartzkopff, W.:
Die chemische Zusammensetzung von Pleurahöhlener-
güssen in Abhängigkeit von Änderungen in den Fil-
trations- und Diffusionsraten.
Z. klin. Med. 155, 65-87 (1958)
34. Shaw, D.B., Brews, V.A.:
An electrophoretic study of serum and pleural
fluid proteins in chest diseases.
J. clin. Path. 9, 251-254 (1956)

35. Stahl, E.:
Dünnschichtchromatographie.
S. 361 ff, 374 ff, Springer-Verlag, Heidelberg, 2.
Aufl. (1967)
36. Switzer III, R.C., Merrill, C.R., Shifrin, S.:
A Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Pro-
teins and Peptides in Polyacrylamide Gels.
Anal. Biochem. 98, 231-237 (1979)
37. Touzek, M., Blahnik, Z., Radl, J.:
Die Eiweißkörper von Pleuraergüssen (tschech.).
Cas. Lek. ces. 98, 884-888 (1959)
38. Trinder:
Cholesterol.
Ann. Clin. Biochem. 6, 24 (1969)
39. Vanni, P., Ippolito, A.:
Studio elettroforetico dei versamenti cavitari.
Arch. Pat. clin. Med. 33, 113-124 (1956)
40. Wahlfeld, A.W., in Bergmeyer, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse.
Band II, Verlag Chemie, Weinheim, 3. Auflage
(1974)

41. Wathius, M.D.:

A comparison of proteins in serum and pleural fluid.

Brit. J. Tuberc. 52, 170-176 (1958)

42. Zinneman, H.H., Johnson, J.J., Lyon, R.H.:

Proteins and mucoproteins in pleural effusions.

Brit. med. J. 5049, 863-865 (1957)

LEBENS LAUF

28. April 1958	geboren in München als erstes Kind des Studienrats Hansjörg Lobentanzer und der Studienassessorin Elisabeth Lobentanzer, geb. Helfrich
1964	Einschulung in die Volksschule München, Hinterbärenbadstraße
1968	Eintritt in das Ludwigsgymnasium, München
1977	Ablegung der Reifeprüfung
1978	Beginn des Medizinstudiums an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
1979	Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität, München
1980	Ärztliche Vorprüfung
1981	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1983	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1984	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Erteilung der Ärztlichen Approbation
Oktober 1984	Tätigkeit als Praxisassistentin bei Dres. med. Ganß, Allgemeinärzte, Falkenstein/Opf.
Nov. 1984 -	
April 1985	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik im Alpenpark, Bad Wiessee
Mai/Juni 1985	Tätigkeit als Praxisassistentin bei Dr. med. Weise, Praktischer Arzt, Vöhringen
Juli - Dez. 1985	Tätigkeit als Assistenzärztin im Krankenhaus Hindelang/Allgäu, Chirurgische Abteilung
August 1985	Vermählung mit Stabsarzt Herbert Weiser
Jan. - Aug. 1986	Tätigkeit als Praxisassistentin bei Dr. med. Thum, Internist, Belegarzt im Krankenhaus Hindelang

Eva Weiser

